

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

ADN TUMORAL EXTRACELULAR EN PLASMA

DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.

VALOR PRONÓSTICO.

ANTONIO CARLOS SÁNCHEZ RUIZ

MADRID, 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

**ADN TUMORAL EXTRACELULAR EN PLASMA
DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.
VALOR PRONÓSTICO.**

Memoria de tesis que presenta

Antonio Carlos Sánchez Ruiz

para optar al grado de Doctor

Director de Tesis

Dr. Félix Bonilla Velasco

Tutor de Tesis

Dra. Pilar España Saz

Unidad de Genética Molecular. Servicio de Oncología Médica
Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid

Dr. FÉLIX BONILLA VELASCO, JEFE DE SECCIÓN DE ONCOLOGIA MÉDICA
Y RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO:

CERTIFICA: Que Don ANTONIO CARLOS SÁNCHEZ RUIZ, DNI 27483120, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado “ADN TUMORAL EXTRACELULAR EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA. VALOR PRONÓSTICO”, y considero que reúne las condiciones necesarias para ser presentado y sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 31 de Agosto de 2006

Dr. Félix Bonilla Velasco

**Dra. Pilar España Saz
Tutora
Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que con su colaboración han hecho posible la realización de esta Tesis:

En primer lugar, y sobre todo, quiero dar las gracias al Dr. Félix Bonilla, Director de la misma, porque sin su enorme ayuda no hubiera sido posible. Le agradezco su sabia orientación, consejo y todo el tiempo, que con gran paciencia ha dedicado a su elaboración.

Agradezco a la Dra. España, como Tutora de la misma, su disponibilidad en todo momento, sus consejos, su interés y colaboración haciendo todo lo posible para su consecución.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. José Miguel García por la intensa colaboración que me ha prestado en la realización e interpretación de los resultados y sus aclaraciones puntuales fundamentales para la calidad científica de este trabajo.

Agradezco a todo el Servicio de Oncología Médica la colaboración prestada en todo momento, especialmente al Dr. Provencio por su confianza y aliento permanente a nivel tanto profesional como personal, así como al resto de adjuntos y residentes, por su valiosa amistad y su ayuda continua.

A todos los componentes de la Unidad de Genética Molecular del Servicio de Oncología Médica por su colaboración técnica, humana y, por la ayuda prestada en la recogida y preparación del material.

A mis amigos y, sobre todo a mi familia, a quien doy las gracias por todo el apoyo y ánimo que siempre me ofrecen y a la que dedico esta tesis, por permanecer siempre a mi lado.

RESUMEN

El cáncer de mama es un problema de salud pública, ya que constituye la primera causa de mortalidad de la mujer en el mundo occidental y su tumor más frecuente. En España su incidencia anual es de 16.000 casos. Más del 30% de las pacientes diagnosticadas en estadio precoz presentarán una recaída de su enfermedad a lo largo de su evolución. El tratamiento adyuvante ha demostrado disminución del número de recaídas y mejoría en la supervivencia. Los marcadores pronósticos actuales pueden determinar el riesgo de recaída de las pacientes y, seleccionar grupos de mal pronóstico en los que poder aplicar tratamientos adyuvantes para reducir los índices de recaídas. Sin embargo estos marcadores no son perfectos y un buen número de pacientes van a recaer pese a considerarse de buen pronóstico, por lo que son necesarios nuevos factores pronósticos para predecir mejor la evolución de las pacientes y realizar una mejor selección de aquellas subsidiarias de recibir un tratamiento adyuvante.

La presencia de ADN extracelular en suero y plasma de personas sanas y en pacientes con cáncer es un hecho ya conocido. Mediante técnicas cualitativas se puede correlacionar este ADN circulante con el ADN del tumor de los pacientes con cáncer. Esto permite, mediante una determinación en sangre periférica, la obtención de material genético derivado del tumor y, su estudio podría suponer un indicador de la presencia y extensión del tumor en las pacientes. Pretendemos evaluar el valor pronóstico del ADN tumoral libre en plasma y su capacidad de discriminar grupos de peor pronóstico entre las pacientes en estadios iniciales.

En el presente estudio se ha realizado la determinación de ADN plasmático al diagnóstico con características de ADN tumoral a un grupo no seleccionado de 147 pacientes con cáncer de mama en estadios operables y, se ha realizado un seguimiento de cinco años, para valorar su relación con las características clínico-patológicas del tumor, el número de recaídas, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. Se ha comparado su valor en relación con otros factores pronósticos.

Para la caracterización del ADN se ha analizado la pérdida de heterocigosidad usando seis marcadores tipo microsatélite y la presencia de mutaciones en TP53 en las muestras de ADN plasmático y tejido tumoral.

Se encontró presencia de ADN tumoral circulante en el 43 % de las pacientes, y se relacionó con la presencia de estadios más avanzados. El número de recaídas y de fallecimientos se correlacionó positivamente con la presencia de ADN tumoral extracelular en plasma.

Las pacientes que presentaban ADN plasmático positivo al diagnóstico tuvieron mayor número de recaídas y peor supervivencia libre de enfermedad a los tres y cinco años. Se demostró una tendencia a peor supervivencia a los cinco años. En los estadios iniciales no logra discriminar grupos de buen pronóstico.

Concluimos que la determinación de ADN libre en plasma con presencia de alteraciones tumorales, aunque se relaciona con la supervivencia de las pacientes, no ofrece mayor utilidad que los factores pronósticos habituales en las pacientes con cáncer de mama.

SUMMARY

Breast cancer is the first leading cause of cancer death in women and, the most common cancer among women in western countries. The incidence rate in Spain is 16.000 new breast cancer per year. More than 30% of the women diagnosed in early stages will recur. Adjuvant treatment can decrease number of recurrences and to increase the overall survival. Prognostic factors reflect the tumor tendency to spread and they help us to select “high-risk” patients where adjuvant treatment could be more useful to decrease recurrences. However, with the current clinical markers a significant number of women, considered as of good prognosis, will recur, so more sensitive and specific prognostic indicators are needed for a better selection of patients.

It is already known that free plasmatic DNA can be found in blood samples of healthy people and in cancer patients. Genetic changes identical to those found in primary tumor DNA have been observed in extracellular circulating DNA using qualitative techniques. A simple blood sample provides enough genetic material derived from tumor cells. Through the study of this material we could obtain a good indicator of persistence and/or spread of disease in cancer patients. We pretend to assess the prognostic significance of extracellular circulating DNA and its ability to discriminate patients having a worse prognosis among the “good risk” group of patients.

In this study we analysed free circulating DNA with features of tumor DNA at diagnosis, in a non-selected group of 147 patients with early stage breast cancer; after a follow-up period of five years, we correlate clinical characteristics, disease-free survival and overall survival with extracellular circulating DNA. The relationship with other risk factors have also been studied.

We use six polymorphic microsatellite markers and mutations in the TP53 gene to identify and to characterize the tumor and plasmatic DNA.

Alterations in tumor DNA were present in 43% of the patients and, they were associated with more advanced stages. Tumor relapses and cancer deaths correlated with the presence of free circulating tumor DNA at diagnosis.

Worse disease-free survival at three and five years was associated with positive DNA at diagnosis. We observed a tendency to worse five year overall survival in patients with extracellular circulating DNA. In early stages of breast cancer, plasmatic DNA was not able to discriminate between good and bad risk groups of patients.

We conclude that the determination of plasma DNA with tumor characteristics, although is associated with worse global survival, is not a more useful marker for selecting poor-risk patients, than the classical prognostic factors in breast cancer patients.

A MI FAMILIA

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER	2
ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER DE MAMA	4
• Epidemiología	4
• Factores de riesgo	5
○ Factores demográficos y sociales	5
○ Historia previa de cáncer de mama	6
○ Factores familiares y hereditarios	6
○ Factores mamarios	7
○ Factores hormonales endógenos	7
○ Factores hormonales exógenos	8
○ Factores dietéticos	8
○ Radiaciones ionizantes	9
• Modelos de estimación de riesgo de cáncer de mama	9
• Enfoque del paciente con cáncer de mama	10
• Tratamiento	11
○ Tratamiento local: cirugía y radioterapia	11
○ Tratamiento sistémico: quimioterapia y hormonoterapia	12
• Seguimiento	13
• Cribaje del cáncer de mama	14
FACTORES PRONÓSTICOS Y CÁNCER DE MAMA	16
• Importancia de los factores pronósticos	16
• Factores pronósticos establecidos en cáncer de mama	17
○ Afectación ganglionar axilar	17
○ Tamaño tumoral	17
○ Tipo histológico	17
○ Grado de malignidad histológica	18
○ Invasión vascular y linfática	18
○ Índice de proliferación	18
○ Receptores hormonales de estrógenos y progesterona	19
• Necesidad de nuevos factores pronósticos	19
• Factores pronósticos moleculares	20

• Marcadores tumorales séricos como factores pronósticos	23
ÁCIDOS NUCLEICOS TUMORALES Y CÁNCER DE MAMA	26
• Estudio de las células tumorales y ácidos nucleicos circulantes	26
○ Células tumorales circulantes	26
○ Ácidos nucleicos tumorales circulantes	28
• Ácidos nucleicos circulantes y cáncer	29
○ Historia y desarrollo	29
○ Origen de los ácidos nucleicos en sangre periférica	29
○ Técnicas de estudio de los ácidos nucleicos	32
○ Utilidad de los ácidos nucleicos tumorales circulantes	33
• Limitaciones de la técnica	34
CONSIDERACIONES FINALES	36
II.- OBJETIVOS	38
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	40
SELECCIÓN DE PACIENTES Y PARÁMETROS CLÍNICOPATOLÓGICOS	41
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	46
EXTRACCIÓN Y MANEJO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	47
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	49
ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE POLIACRILAMIDA	51
GENÉTICA DEL CÁNCER DE MAMA Y MUTACIONES DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES TP53	54
PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD	58
CARACTERIZACIÓN DEL ADN PLASMÁTICO	60
• Análisis de microsatélites	60
• Análisis de mutaciones del gen TP53	60
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
• Análisis univariante	62
• Análisis multivariante	62

IV.- RESULTADOS	63
DETECCIÓN DE ADN TUMORAL PLASMÁTICO	64
CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA SERIE	66
SEGUIMIENTO Y RECAÍDAS A LOS 3 AÑOS	69
SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD A LOS 3 AÑOS	72
SEGUIMIENTO Y RECAÍDAS A LOS 5 AÑOS	75
SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD A LOS 5 AÑOS	76
SUPERVIVENCIA GLOBAL A LOS 5 AÑOS	80
ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE ADN TUMORAL PLASMÁTICO CON CARGA TUMORAL	84
• Relación del ADN tumoral plasmático con la afectación axilar	84
• Relación del ADN tumoral plasmático y del grado histológico con la carga tumoral	84
INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO Y ADN TUMORAL PLASMÁTICO	89
ANÁLISIS INDEPENDIENTE DE MARCADORES DE MICROSATÉLITE Y TP53	93
V.- DISCUSIÓN	96
PRESENCIA DE ADN TUMORAL EN PLASMA	97
• Detección, cuantificación y caracterización del ADN plasmático	97
• Técnicas utilizadas para la caracterización del ADN plasmático	99
• Elección de marcador genético para la caracterización del ADN plasmático	101
• Papel de los marcadores genéticos utilizados	102
• Origen y mecanismos de liberación del ADN plasmático	103
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS: UTILIDAD	104
• Presencia de ADN tumoral plasmático y correlaciones clínico-patológicas	104
• Relación con la supervivencia libre de enfermedad a los tres años	105
• Relación con la supervivencia global: resultados a cinco años	106
• Valor del ADN tumoral plasmático, relación con carga tumoral y otros factores pronósticos	109

	Índice
PERSPECTIVAS FUTURAS	114
VI.- CONCLUSIONES	118
VII.- BIBLIOGRAFÍA	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características clínico-patológicas de las 142 pacientes de la serie y su correlación con la presencia o ausencia de ADN al diagnóstico.

Tabla 2: Supervivencia libre de enfermedad a los 3 años del total de las pacientes de la serie.

Tabla 3: Variables con valor estadísticamente significativo tras el análisis univariante en relación con la supervivencia libre de enfermedad a los 3 años.

Tabla 4: Modelo de riesgo proporcional para la supervivencia libre de enfermedad a los 3 años (análisis multivariante).

Tabla 5: Supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del total de las pacientes de la serie.

Tabla 6: Análisis de la asociación entre la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico y la supervivencia libre de enfermedad con una media de seguimiento de 58 meses.

Tabla 7: Análisis de la asociación entre la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico y la supervivencia global de las pacientes con una media de seguimiento de 58 meses.

Tabla 8: Frecuencia de la pérdida de heterocigosidad para cada marcador de microsatélite y de las mutaciones del gen TP53 en el tejido tumoral y en las muestras de plasma y análisis univariante de acuerdo con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad para cada una.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del protocolo experimental.

Figura 2: Imagen de un gel de electroforesis teñido con plata que muestra una LOH en la región 17q21 (microsatélite D17S855) en el ADN extraído del tejido tumoral y en el ADN extraído del plasma.

Figura 3: Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad a los 3 años de las 142 pacientes de la serie de acuerdo con la presencia o ausencia de ADN plasmático al diagnóstico.

Figuras 4A y 4B: Curvas de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación a la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico.

Figura 5: Curvas de supervivencia libre de enfermedad de Kaplan-Meier en relación con el estadio tumoral.

Figura 6A y 6B: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación a la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico en el grupo de pacientes según la afectación ganglionar.

Figura 7A y 7B: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación a la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico en el grupo de pacientes según la carga tumoral.

Figura 8A y 8B: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación al grado histológico en el grupo de pacientes según la carga tumoral.

Figura 9: Curvas de Kaplan-Meier analizando la supervivencia global considerando la presencia de ADN tumoral plasmático en cuatro grupos establecidos de pacientes en base a un uniforme tipo de tratamiento.

Figura 10: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación al ADN tumoral al diagnóstico en las pacientes tratadas con quimioterapia y con hormonoterapia.

Figura 11A y 11B: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier entre las pacientes de la serie divididas en dos grupos dependiendo de su evolución, y considerando en cada grupo la positividad del ADN libre en plasma en el momento del diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER

El cáncer es un importante problema de salud pública en todo el mundo. Es la segunda causa de muerte y cada año fallecen alrededor de 7 millones de personas por cáncer, lo que supone el 12,5% de la mortalidad mundial, sólo por debajo de la enfermedad arterial coronaria. Se diagnostican más de 11 millones de personas anualmente, de los que sólo la mitad sobrevivirán más allá de cinco años, y se estima que 20 millones de personas están viviendo con cáncer. Su incidencia está aumentando, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo, debido a la exposición a los factores de riesgo como el tabaco y otros carcinógenos, dieta inadecuada, inactividad física, e infecciones. El rápido envejecimiento de la población es un factor importante en los países desarrollados. En el año 2020 habrá 16 millones de casos nuevos de cáncer según datos de la Organización Mundial de la Salud.¹

En el año 2000 hubo 1.122.000 muertes por cáncer entre los 25 países miembros de la Unión Europea². Se estima que en toda Europa en el 2004 ha habido 2.886.800 nuevos casos de cáncer y que 1.711.000 de personas han fallecido por esta causa³.

En España cada año se producen alrededor de 150.000 casos nuevos de cáncer (90.000 en hombres y 60.000 en mujeres)⁴. En términos absolutos es la primera causa de muerte, con 96.907 muertes en el año 2004 (61.013 en hombres y 35.894 en mujeres) supuso el 25,2% de todas las defunciones.

Los estudios epidemiológicos están ayudando a comprender la distribución, prevalencia e incidencia del cáncer, y permitiendo así desarrollar programas de prevención y de diagnóstico precoz. La prevención⁵ del cáncer puede lograr reducir la incidencia de algunos tumores, bien con medidas sencillas como las recomendaciones sobre los efectos nocivos del tabaco en fumadores y otros agentes en el ámbito laboral, o con medidas basadas en estudios genéticos de selección de portadores de mutaciones en cánceres hereditarios. El diagnóstico precoz⁶ del cáncer permite su detección en las fases iniciales cuando la enfermedad es tratable y potencialmente curable. En los grupos de población en los que se puede aplicar permite, mediante programas de despistaje, la selección de personas con riesgo a las que aplicar métodos diagnósticos precisos para

facilitar su detección y un tratamiento en las fases más tempranas de la enfermedad, con una demostrada reducción de la morbilidad y mortalidad de la misma⁷.

Los métodos diagnósticos proporcionan un estudio detallado de la extensión de la enfermedad, que resulta imprescindible a la hora de poder ofrecer las alternativas terapéuticas adecuadas. Las técnicas de imagen han ganado en precisión y son el principal método para establecer la extensión de la enfermedad⁸. Otras técnicas como la inmunohistoquímica, los marcadores tumorales séricos, y la detección de células tumorales en sangre periférica, están produciendo cambios importantes en el manejo de los pacientes y en la comprensión de los factores pronósticos del cáncer.

Junto a los parámetros puramente clínicos del tumor hay que tener en cuenta que el diagnóstico de cáncer supone una serie de implicaciones sociales y económicas, así como psicológicas en el paciente y su familia de una gran trascendencia⁹.

Los avances en el tratamiento del cáncer se van incorporando de una manera progresiva a la práctica clínica, disponiendo ahora no sólo de un gran número de citostáticos, sino de nuevas alternativas y tratamientos dirigidos contra componentes de las células tumorales, sus antígenos, sus proteínas expresadas y la vascularización de los tumores¹⁰. La aplicación de este nuevo arsenal terapéutico, fruto de una investigación precisa y laboriosa en la lucha contra el cáncer, está empezando a dar sus frutos y ya se ven claramente los avances que van configurando un cambio en el concepto de cáncer y su tratamiento. Hay que tener presente que el cáncer es una enfermedad genética y heterogénea, con muchas vías moleculares implicadas en el proceso oncogénico y que su conocimiento puede ayudar a comprender su origen, proliferación y extensión, las vías de escape de las células tumorales a los tratamientos aplicados y otros mecanismos funcionales de la célula tumoral¹¹. La Biología Molecular ha proporcionado una mejora en el conocimiento de las bases implicadas en el inicio y desarrollo del cáncer, que están permitiendo la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevos fármacos que podrían modificar la historia natural de muchos tumores¹².

ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER DE MAMA

- **Epidemiología**

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres occidentales y la primera causa de mortalidad en la mujer en el mundo occidental. Su incidencia a nivel mundial se estima entre 1 y 1,2 millones de casos en el año 2000, con una mortalidad de 375.000 casos, lo que supone el 22,9% de todos los tumores malignos en la mujer¹³.

En Europa, en el año 2004, el cáncer de mama fue el tercero en incidencia y el primero en mujeres, con una estimación de 370.100 casos, el 12,8% de todos los tumores, y con una mortalidad estimada de 129.900, que representa el 7,6% de todas las muertes por cáncer³.

En España⁴, la incidencia de cáncer de mama se estima en 16.000 nuevos casos al año y su mortalidad fue de 5.812 mujeres en el año 2004. Al igual que en otros países occidentales, la incidencia de cáncer de mama ha sufrido un aumento, más marcado entre las décadas del 70 al 90. La tasa de incidencia ajustada por edad en 1998 era de 67 por 100.000 que, sin embargo, era la menor de la Unión Europea. Supone la primera causa de muerte en mujeres mayores de 35 años.

La tendencia en la incidencia del cáncer de mama se ve influenciada por los cambios de los factores de riesgo en la población (disminución de la fertilidad, incremento de peso...), el diagnóstico precoz debido a los programas de cribaje y a la mayor conciencia social sobre el tema. En Europa existe un incremento en la incidencia del cáncer de mama en los últimos años en todos los países, pero se está consiguiendo una estabilización de la mortalidad o incluso disminución que, probablemente, sea reflejo de la mejora en los estudios de detección precoz y de la optimización del tratamiento. La tendencia en la mortalidad muestra un marcado descenso en algunos países como en Suecia y en el Reino Unido del 3%, y estabilización en otros. En España, la mortalidad por cáncer de mama comienza a descender desde el año 1992, a un ritmo del 1,4%¹⁴. La tendencia general en Europa de disminución en las tasas de mortalidad, que se aprecia desde los años 80, puede ser debida a la mejora en la

detección precoz por los programas de cribaje, aunque ésta se observaba también antes de que dichos programas fueran introducidos y en grupos de edad donde no se realizaron. A su vez también se ha observado en países que no realizan programas de cribaje. Así pues, puede ser reflejo tanto de los programas de cribaje, como de los avances en el tratamiento o de la mejora de la atención sanitaria general.

- **Factores de riesgo**

Los estudios epidemiológicos nos han proporcionado mucha información acerca de los factores de riesgo de padecer cáncer de mama¹⁵. El análisis de estos factores nos permite estimar el riesgo de desarrollar cáncer de mama en una mujer de una manera individualizada. Los más importantes son la edad, la historia previa de cáncer de mama, la historia familiar y hereditaria de cáncer de mama, la exposición a estrógenos endógena o exógena, la presencia procesos benignos mamarios como hiperplasias atípicas, así como otros factores medioambientales y dietéticos menos conocidos. Los podemos agrupar en diferentes categorías:

- **Factores demográficos y sociales:**

Algunos factores sociodemográficos se asocian al cáncer de mama, pero están relacionados con el estilo de vida, los factores reproductivos y la influencia hormonal. La frecuencia de cáncer de mama es 100 veces más frecuente en mujeres que en varones¹⁶. La edad es el factor de riesgo aislado más importante para el desarrollo del cáncer de mama. Su incidencia va aumentando progresivamente con la edad y el 60% de los tumores de mama ocurren después de los 60 años, pero dicha progresión es considerablemente menos acusada al alcanzar la menopausia. Hay dos niveles de máxima incidencia, el primero fundamentalmente antes de la menopausia, entre los 45 y 49 años y el segundo en la postmenopausia, hacia los 65 años. Una mujer que alcanza la menopausia a los 45 años tiene la mitad de riesgo que si la alcanza tras los 55 años. La curva de incidencia se aplanan a los 75-80 años y luego desciende ligeramente¹⁷. Las mujeres de alto nivel socioeconómico tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama, hasta dos veces superior sobre las de bajo nivel, lo que puede estar relacionado con factores reproductivos, como la paridad y la edad del primer embarazo¹⁸. Las mujeres

blancas caucasianas tienen más incidencia que las de origen latino, afro-americano o asiático, diferencias que también pueden ser debidas a factores genéticos modificados por factores ambientales.

- **Historia previa de cáncer de mama:**

Las pacientes con historia previa de cáncer de mama tienen un riesgo incrementado de cáncer de mama contralateral del 1% anual, con un riesgo acumulado a lo largo de su vida de cinco veces el de la población general. Los factores que influyen en este riesgo son la historia familiar o hereditaria de cáncer de mama, historia de radiación a edad joven y la histología de carcinoma lobulillar en el tumor primario¹⁹.

- **Factores familiares y hereditarios:**

Los factores de riesgo familiares y hereditarios son complejos, se identifican a través de la historia familiar y están influenciados por otros como los ambientales y los estilos de vida²⁰. La historia familiar es uno de los factores de riesgo más reconocidos para el desarrollo del cáncer de mama. Entre un 15-20% de los casos de cáncer de mama ocurren en mujeres con antecedentes familiares, en los que no se identifica un patrón de herencia determinado. La tasa de incidencia es 1,80 superior si se tiene un familiar afectado y 3,20 si se tienen dos²¹. El riesgo aumenta si los familiares han sido diagnosticados a una edad temprana y también con la presencia de casos de bilateralidad. El cáncer de mama familiar se puede explicar por el simple azar (es una enfermedad relativamente prevalente), porque las familias comparten factores de riesgo socioculturales, por exposición a carcinógenos ambientales, por la presencia de genes de baja penetrancia no conocidos o por interacciones de estos genes con factores ambientales.

El cáncer de mama hereditario es una entidad diferente, que está definida por un patrón de herencia autosómica dominante de susceptibilidad al cáncer de mama con elevada penetrancia. Se estima que entre el 5-10% de los casos de cáncer de mama se explican por su pertenencia a alguno de los síndromes descritos, siendo el más frecuente el síndrome hereditario de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario, debido a mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2²². El gen BRCA1 está localizado en el

cromosoma 17q21 y su mutación parece ser responsable del 45% de casos de cáncer de mama hereditario y de más del 90% de los casos que presentan además cáncer de ovario. Estas pacientes tienen un riesgo entre el 55% y el 85% de desarrollar cáncer de mama y un 20-40% de desarrollar cáncer de ovario a lo largo de su vida. El gen BRCA2 se localiza en el cromosoma 13q13 y se encuentra mutado en el 35% de casos con cáncer de mama hereditario. Confiere un riesgo de desarrollar cáncer de mama del 30% al 80% y de cáncer de ovario del 15% al 30%, además se asocia con una mayor incidencia de otros cánceres como páncreas, y cáncer de mama y de próstata en el varón²³. Han sido descritos otros síndromes hereditarios mediados por mutaciones en genes como TP53 y PTEN, que tienen influencia en menos del 1% de los casos de cáncer de mama hereditario²⁴.

○ **Factores mamarios:**

Los procesos proliferativos benignos de la mama incrementan el riesgo de cáncer de mama, las lesiones no proliferativas no lo incrementan. Las lesiones proliferativas sin atipia como los fibroadenomas, hiperplasia, adenosis esclerosante y papiloma intraductal tienen un riesgo de 1,3 - 2 de desarrollar un cáncer de mama²⁵. Las lesiones proliferativas con atipias, como la hiperplasia ductal y lobulillar atípica, el carcinoma lobulillar in situ, tienen un riesgo mayor de hasta tres a cinco veces y se consideran precursoras del cáncer de mama invasivo, aunque no todos los casos derivan en cáncer posteriormente²⁶. El riesgo de cáncer de mama contralateral es del 5% a los 10 años en las mujeres que han tenido un carcinoma ductal in situ. El patrón mamográfico del parénquima mamario es otro factor de riesgo. Las mujeres con parénquima denso o glandular tienen entre 1,8 y 6 veces más riesgo que las que presentan un patrón con menos extensión de la densidad mamaria como el graso o atrófico²⁷.

○ **Factores hormonales endógenos:**

La exposición a estrógenos incrementa el riesgo de cáncer de mama. Su producción tiene lugar en los ovarios y, tras la menopausia, en las suprarrenales.

La menarquia temprana se asocia con alto riesgo de desarrollo de cáncer de mama²⁸. Cuanto más joven se tiene el primer embarazo más disminuye el riesgo de

cáncer de mama y si se tienen pasados los 30 años, se iguala al de las nulíparas. Las nulíparas tienen un riesgo entre 1,2 y 1,7 más de cáncer de mama. Tras el embarazo aumenta el riesgo de cáncer de mama, y éste comienza a mostrar sus efectos protectores a partir de los 10 años de producirse²⁹. La lactancia materna también produce disminución del riesgo, bien por el retraso en el reestablecimiento de la ovulación o bien debido a la producción de prolactina que inhibiría la producción estrogénica³⁰. Cuanto más tarde se alcanza la menopausia, va aumentando el riesgo de cáncer de mama, debido a la prolongada exposición a estrógenos endógenos³¹. El nivel de estrógenos circulantes en mujeres postmenopáusicas se asocia con el riesgo de cáncer de mama³². Las mujeres obesas tienen mayor conversión periférica de estrógenos a nivel suprarrenal y más riesgo de cáncer de mama y la castración o la toma de antiestrógenos como tamoxifeno parece reducir dicho riesgo³³.

Todas estas situaciones mencionadas anteriormente establecen una asociación causal entre niveles elevados de estrógenos y el riesgo de cáncer de mama, pero sin embargo dichos datos se han obtenido en su mayoría de estudios observacionales, y son pocos los estudios prospectivos que han analizado dicha relación.

- **Factores hormonales exógenos:**

El uso de anticonceptivos orales y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer de mama es un tema abierto. Un metaanálisis³⁴ encontró un ligero aumento del riesgo de 1,24 pero hay estudios prospectivos que no han encontrado una clara asociación³⁵. La terapia hormonal sustitutiva durante corto periodo de tiempo parece no incrementar el riesgo de cáncer de mama, no así si esta se toma durante largos periodos de tiempo³⁶.

- **Factores dietéticos:**

Existe una relación entre el índice de masa corporal y el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, así como también con la ingesta de grasa³⁷. La actividad física podría ser un factor protector³⁸. También otros factores como la ingesta de alcohol se han asociado a cáncer de mama³⁹.

- **Radiaciones ionizantes:**

Los efectos de la radiación en el parénquima mamaria son dosis-dependiente. La exposición a radiaciones ionizantes a edad joven, sobre todo entre 10-14 años, se asocia a mayor riesgo de cáncer de mama⁴⁰, debido a la particular sensibilidad del parénquima mamario prepuberal y puberal a los efectos carcinógenos de la radiación. Las dosis bajas, como las usadas en los medios radiológicos diagnósticos no se asocian con un riesgo incrementado de cáncer de mama. Las dosis moderadas, como las que se emplean en las tomografías de tórax tras neumotórax realizados como tratamiento de tuberculosis se han asociado a un incremento significativo de cáncer de mama⁴¹. Las altas dosis, como las utilizadas durante la radiación tipo “mantle” en el tratamiento de los linfomas de Hodgkin, se asocian con un incremento significativo de cáncer de mama⁴².

- **Modelos de estimación de riesgo de cáncer de mama**

En los últimos años se han establecido varios modelos, mediante la combinación de múltiples factores de riesgo, que nos permiten estimar de una manera cuantitativa el riesgo individual de una mujer de padecer cáncer de mama. Entre los más utilizados tenemos el modelo de Gail⁴³ y el de Claus⁴⁴.

El modelo de Gail fue publicado en 1989 y considera las siguientes variables: número de familiares de primer grado con cáncer de mama, edad del primer embarazo a término, edad de menarquia, número de biopsias mamarias y la presencia de hiperplasia atípica. Este modelo no ha sido validado en todos los subgrupos de población, y en mujeres jóvenes o con predisposición genética para el cáncer de mama puede subestimar el riesgo.

El modelo de Claus, publicado en 1994, estima el riesgo en intervalos de 10 años para mujeres con familiares afectados de cáncer de mama de primer o de segundo grado y se acerca más al riesgo familiar y hereditario que el modelo anterior.

El Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos ha simplificado la estimación del riesgo de cáncer de mama mediante el desarrollado un modelo

computerizado de fácil manejo al que se puede acceder a través de una página en la red (<http://brca.nci.nih.gov/brc>). Sin embargo, hay que considerar que todos los modelos desarrollados para el cálculo del riesgo de cáncer de mama son orientativos ya que presentan importantes limitaciones al no considerar todos los factores de riesgo posibles.

- **Enfoque del paciente con cáncer de mama**

La primera manifestación clínica del cáncer de mama suele ser la aparición de una masa indolora, o bien retracción del pezón con o sin galactorrea, y en etapas más avanzadas, retracción de la piel, edema cutáneo y ulceración. Ante estos hallazgos se ha de hacer una exploración de la mama por cuadrantes para la detección de nódulos o masas y palpación ganglionar. El paso siguiente suele ser la realización de una mamografía, que aporta una sensibilidad del 90% y una especificidad del 94%. La ecografía y la resonancia mamaria pueden ser de ayuda en algunos casos. Ante toda paciente con masa mamaria palpable o alteración mamográfica se ha de buscar un diagnóstico anatomopatológico. Inicialmente se puede hacer una punción aspiración con aguja fina o un tru-cut con aguja gruesa que permite la obtención de un cilindro de material. El diagnóstico del cáncer de mama se basa en la biopsia. Esta nos clasificará al tumor en carcinoma intraductal “in situ” o en carcinoma infiltrante, con sus variantes ductal, lobulillar, mucinoso, medular, papilar, coloide o tubular. El informe patológico incluye el tipo histológico de la neoplasia, el grado, las dimensiones, el estado de los márgenes, la presencia o no de invasión vascular o linfática, el estado de los receptores hormonales de estrógenos y progesterona y el análisis del HER2. Habitualmente se realiza un estudio de extensión que suele constar de hemograma y bioquímica, radiografía de tórax, ecografía de abdomen y gammagrafía ósea. Tras esto, el tumor se estadifica mediante la clasificación TMN (del inglés tumor, node, metastases), según el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la presencia o no de metástasis⁴⁵. La estadificación del cáncer permite clasificar grupos con un pronóstico similar, seleccionar el tratamiento más correcto para cada caso y comparar los resultados de distintas series y modalidades de tratamiento. En primer lugar se lleva a cabo una estadificación clínica que se basa en los resultados de la exploración clínica y de las pruebas complementarias, y posteriormente se realiza la estadificación patológica,

según los hallazgos encontrados en la pieza tumoral tras su extirpación quirúrgica. La clasificación del cáncer de mama se va actualizando periódicamente dado el avance en las técnicas diagnósticas como el ganglio centinela, inmunohistoquímicas y moleculares. La última clasificación se ha consensuado por el American Joint Committee on Cancer y se publicó en el año 2002⁴⁶.

- **Tratamiento**

Una vez establecido el diagnóstico el tratamiento depende del estadio de la enfermedad. El manejo del cáncer de mama no diseminado se basa en la combinación de tratamiento local sobre la mama y áreas ganglionares regionales junto con tratamiento sistémico. Los pilares del tratamiento local son la cirugía radical o cirugía conservadora más radioterapia. El tratamiento sistémico se basa en la aplicación de quimioterapia, hormonoterapia o ambas.

- **Tratamiento local: cirugía y radioterapia**

La cirugía ha cambiado drásticamente en los últimos 20 años, permitiendo realizar intervenciones menos agresivas, que han pasado desde la mastectomía radical convencional con resección de la mama y los músculos pectorales, a la mastectomía radical modificada tipo Madden, preservando el pectoral mayor y con mejor resultado estético, hasta la cirugía conservadora mediante cuadrantectomía o tumorectomía, asociando radioterapia posterior para erradicar enfermedad residual o multifocal. La linfadenectomía axilar se realiza rutinariamente y es un procedimiento fundamentalmente diagnóstico, con un valor terapéutico no del todo aclarado. Todas estas técnicas quirúrgicas ofrecen supervivencia similar⁴⁷. Si se ha procedido a un tratamiento con cirugía conservadora, posteriormente se ha de administrar radioterapia, que logra reducir el riesgo de recaída local ipsilateral de un 39% a un 14%⁴⁸. Si se ha realizado mastectomía, no en todos los casos estará indicada la administración con radioterapia. El riesgo de recurrencia de la enfermedad tras la mastectomía se relaciona con el número de ganglios axilares afectados. La irradiación postmastectomía reduce en dos tercios el riesgo de recaída local, sin embargo no ha demostrado un beneficio a largo plazo en la supervivencia, debido al incremento de la mortalidad a largo plazo no

relacionada con el cáncer de mama, asociada sobre todo a efectos cardiovasculares⁴⁹. Para las mujeres con alto riesgo de recaída, el beneficio de la radioterapia sobrepasa los efectos secundarios de ésta, sobre todo en el grupo de mujeres de cuatro o más ganglios linfáticos. Con las nuevas técnicas de planificación y administración de la radioterapia se puede disminuir el riesgo de los efectos cardiovasculares tardíos y otras complicaciones asociadas a dicho tratamiento.

- **Tratamiento sistémico: quimioterapia y hormonoterapia**

Tras un tratamiento local, más del 60% de las pacientes morirán finalmente a causa de la diseminación de la enfermedad. La mayor amenaza del cáncer de mama es la presencia de metástasis a distancia. El control locorregional permite disminuir el riesgo de recaída local y la fuente de metástasis, pero para la eliminación de metástasis ocultas, se requiere de un tratamiento sistémico. El tratamiento sistémico, cuya base es la quimioterapia y la hormonoterapia, ha demostrado reducir el riesgo de recaída de la enfermedad y el de muerte por cáncer de mama en un 10%⁵⁰. Los factores pronósticos, sobre todo la afectación linfática axilar, el tamaño tumoral, el grado histológico, la edad y el estado hormonal, que comentaremos más adelante en extenso, van a determinar cual es el tratamiento idóneo a realizar en el cáncer de mama localizado. El tratamiento con quimioterapia ha demostrado beneficio en todos los grupos de pacientes, siendo éste mayor en los grupos de más riesgo. Así pues, en mujeres menores de 50 años el beneficio en la supervivencia a los 10 años es del 7% si los ganglios son negativos y del 11% si son positivos, mientras que si la mujer tiene más de 50 años el beneficio es un 2% si no tiene afectación axilar y de un 3% si la presenta⁵¹. En la actualidad no existe un régimen considerado estándar de tratamiento con quimioterapia. Las combinaciones de quimioterápicos son más eficaces que la monoterapia. La duración del tratamiento debe ser entre 4 y 6 meses. En pacientes con receptores hormonales positivos, la combinación secuencial de quimioterapia y tratamiento hormonal produce efectos terapéuticos aditivos. Los regímenes de tratamiento con antraciclinas aportan superioridad en eficacia respecto a aquellos que no las contienen⁵². Las combinaciones con taxanos han demostrado, en determinados grupos de pacientes beneficio en supervivencia⁵². Todavía está por aclarar el papel del anticuerpo monoclonal trastuzumab en la adyuvancia de las pacientes con sobreexpresión del receptor HER-2⁵³. El tratamiento con quimioterapia se puede aplicar también de manera neoadyuvante,

previo al tratamiento local, con objeto de facilitar la cirugía conservadora de la mama, sin comprometer la supervivencia⁵⁴.

El tratamiento hormonal pretende reducir la estimulación estrogénica sobre el crecimiento de las células tumorales con dependencia hormonal. En mujeres postmenopáusicas la aplicación del tratamiento hormonal reduce el riesgo de muerte un 11% en el grupo de edad entre 50-59 años y un 33% entre las pacientes de 60-69 años. Tras cinco años de tratamiento adyuvante con tamoxifeno el riesgo de cáncer de mama contralateral se reduce en un 50%⁵⁵. El tratamiento clásico en la adyuvancia hormonal ha sido el tamoxifeno, pero en la actualidad se están incorporando también los inhibidores de la aromatasas. En mujeres premenopáusicas el tratamiento hormonal consigue una reducción del 32% en el riesgo de muerte, disminución del riesgo de recaída y de cáncer de mama contralateral⁵⁵. El tratamiento hormonal en la mujer premenopáusica incluye la ablación ovárica (mediante cirugía o radioterapia, que está actualmente en desuso), análogos LH-RH (hormona liberadora de gonadotropinas) y tamoxifeno.

Las pacientes con cáncer de mama metastásico tienen una supervivencia limitada, en torno a 18-24 meses, y son candidatas a recibir tratamiento sistémico con quimioterapia u hormonoterapia, dependiendo de la agresividad clínica de la enfermedad, la afectación visceral, los síntomas presentes y el estatus hormonal. Las metástasis suelen localizarse en hueso, pulmón, hígado y cerebro. El objetivo del tratamiento es el control de la enfermedad y el mantenimiento o mejora de la calidad de vida.

- **Seguimiento**

Las mujeres que han tenido un cáncer de mama tienen riesgo de recaída durante toda su vida, por lo tanto se recomienda que realicen seguimientos clínicos periódicos. Este riesgo es más elevado durante los primeros cinco años tras el diagnóstico. Además también presentan riesgo de desarrollar un segundo tumor en la mama contralateral. Los objetivos del seguimiento son la detección y tratamiento de la recaída potencialmente curable, evaluación de segundos tumores primarios de mama y reconocimiento y control

de las secuelas de los tratamientos administrados. Sin embargo no se ha demostrado que el diagnóstico precoz de la recaída sistémica produzca beneficio en la supervivencia de las pacientes afectadas. Un seguimiento más intensivo, consistente en gammagrafía ósea, radiología de tórax, ecografía abdominal y analítica logra la anticipación del diagnóstico de la recaída sistémica respecto a un seguimiento basado en exploración clínica y mamografía, pero dado que se trata de una situación clínica no curativa, no se ha demostrado beneficio en supervivencia ni en calidad de vida^{56,57}. Incluso usando otras técnicas diagnósticas como la TAC (tomografía axial computerizada) o el PET (tomografía por emisión de positrones) tampoco parece evidenciarse mejoría en la supervivencia⁵⁸. La determinación de marcadores séricos permite también la detección precoz de la recaída sistémica, aun sin enfermedad clínica evidenciada por las exploraciones complementarias rutinarias, e incluso en estos casos el tratamiento oncológico precoz no ha demostrado beneficio⁵⁹.

No existen estudios aleatorizados que nos indiquen cual es la periodicidad que se ha de seguir para realizar el seguimiento de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama. La mayoría de las recaídas se producen entre 3 y 10 años tras el diagnóstico y el riesgo va disminuyendo posteriormente, aunque se pueden producir recaídas tras más de 15 años desde el diagnóstico⁶⁰. Diversos grupos establecen distintas recomendaciones sobre el seguimiento del cáncer de mama. La American Society of Clinical Oncology recomienda autoexploración mamaria mensual, examen físico cada 3-6 meses los primeros 3 años y cada 6-12 meses los siguientes 2 años y después anual a partir del 5º año, mamografía anual y exploración ginecológica anual⁶¹. De forma rutinaria no recomienda el uso de marcadores, analíticas ni otros estudios radiológicos.

- **Cribaje del cáncer de mama**

El cáncer de mama lo suele detectar la propia enferma notando la presencia de un nódulo en la mama o bien en los programas de cribaje con mamografía.

En la actualidad existen cuatro métodos comúnmente usados para el cribaje del cáncer de mama:

- la autoexploración: no existen datos de que la autoexploración mamaria reduzca la mortalidad por cáncer de mama⁶².

- la exploración clínica mamaria: ha demostrado su valor en el cribaje del cáncer de mama, sobre todo en mujeres con síntomas, aunque en menor medida que la mamografía⁶³.

- la mamografía: el cribaje con mamografía ha demostrado que es capaz de reducir la mortalidad por cáncer de mama en torno al 20-30%, aunque los datos son menos claros en las mujeres menores de 50 años y en mayores de 70⁶⁴.

- la resonancia magnética nuclear está adquiriendo cada vez un papel más relevante, sobre todo en mujeres jóvenes o en mujeres con mutaciones en los genes de predisposición al cáncer de mama BRCA1 o BRCA2, grupos donde la sensibilidad de la mamografía es más baja⁶⁵. Sin embargo todavía no hay datos que demuestren aumento de la supervivencia en estos grupos.

Las guías internacionales ofrecen distintas recomendaciones^{66,67} pero en general éstas se basan en examen físico anual que incluya exploración clínica mamaria, y una mamografía anual o cada dos años para mujeres mayores de 40-50 años y hasta que la expectativa de vida sea menor de 10 años. Las mujeres más jóvenes pero con historia familiar u otros factores de riesgo deberían comenzar el cribaje a edades más tempranas.

El desarrollo de programas de detección precoz está facilitando el diagnóstico en estadios muy precoces de desarrollo, incluso "in situ". El aumento del número de casos de cáncer de mama invasivo ha ido paralelo al aumento del número de casos de cáncer de mama in situ diagnosticados, especialmente del carcinoma ductal in situ, debido al amplio uso de la mamografía como método de cribaje⁶⁸.

FACTORES PRONÓSTICOS Y CÁNCER DE MAMA

- **Importancia de los factores pronósticos**

Todas las pacientes con cáncer de mama no tienen la misma evolución. Hay determinados factores de los tumores y del paciente que condicionan que unos pacientes tengan largas supervivencias y que otros recaigan de una forma precoz y tengan una alta mortalidad. La identificación de estos factores ayuda a pronosticar la evolución de la enfermedad. En base a lo expuesto se ha elaborado el concepto de factor pronóstico. Un factor pronóstico es una variable medida en cada uno de los pacientes de forma individual y que, por sí sola o en combinación con otras variables permite predecir la diferente evolución de cada uno de los individuos que componen una misma población. Conforme éstos van siendo identificados, podemos explicarnos una diferente respuesta en distintos pacientes, con la misma enfermedad, ante un mismo tratamiento, que justifique una evolución y una supervivencia específicas. Un factor pronóstico, para ser considerado útil, debe tener valor predictivo significativo e independiente; ha de ser validado con pruebas clínicas; su determinación debe ser fácil, reproducible y ampliamente disponible, con controles de calidad; debe ser fácilmente interpretable por el médico y ha de tener implicaciones terapéuticas. La identificación de factores pronósticos permite predecir la evolución de una enfermedad, mejorar la selección de los tratamientos más óptimos de acuerdo al riesgo de la propia enfermedad, y además, mejorar el diseño de los ensayos clínicos al definir criterios para la selección de las pacientes y su estratificación por grupos de riesgo⁶⁹. En pacientes con cáncer de mama, nos puede permitir estimar el riesgo de recaída y prever la supervivencia.

Una vez diagnosticado un cáncer de mama, es importante determinar los factores pronósticos que se puedan asociar con el riesgo de recidiva. El más importante es el estadiaje tumoral, basado en la clasificación TNM. El grado histológico y la presencia de receptores hormonales deben ser evaluados en todo tumor. La presencia de invasión vascular y linfática también resulta útil. La determinación de HER2 indica peor pronóstico, aunque todavía no se considera determinante para la indicación de tratamiento adyuvante. La presencia de micrometástasis en ganglios linfáticos, sangre o médula ósea, detectada mediante técnicas moleculares como la reacción en cadena de

polimerasa (PCR), o técnicas inmunohistoquímicas se ha mostrado como un factor de mal pronóstico en estudios retrospectivos, sin embargo no está claro que sea un factor pronóstico independiente ya que se ha asociado a otros factores adversos.

- **Factores pronósticos establecidos en cáncer de mama**

- **Afectación ganglionar axilar**

Es la variable pronóstica más importante en el cáncer de mama para determinar la supervivencia y la recaída. Debe conocerse el número total de ganglios aislados, el número de afectados y su tamaño, la existencia y tamaño de las micrometástasis, el área mayor de invasión ganglionar y la afectación capsular si existe. La supervivencia a los 5 años sin afectación ganglionar es del 82%, comparado con el 73% si tienen entre 1-3 ganglios afectados y del 45% entre 4-12. La probabilidad de recaída y de mortalidad empeora a medida que aumenta el número de ganglios axilares afectados⁷⁰.

- **Tamaño tumoral**

Se correlaciona con la presencia y el número de ganglios axilares afectados y es un factor pronóstico independiente. Un mayor tamaño tumoral se asocia a mayor número de recaídas a distancia. La supervivencia libre de enfermedad a los 20 años es del 88% para tumores menores de 1 cm y de 59% para tumores entre 3 y 5 cm. Es el factor pronóstico más importante en las pacientes sin afectación axilar⁷¹.

- **Tipo histológico**

Las características patológicas del tumor tienen significación pronóstica. Algunos tipos histológicos de cáncer mamario están asociados a un curso clínico favorable, como el carcinoma tubular, coloide, papilar y medular y, tienen un pronóstico más favorable que el carcinoma ductal o lobulillar infiltrante, aunque su incidencia es menor⁷².

- **Grado de malignidad histológica**

Es estimado mediante la escala de Bloom-Richardson, mide el número de mitosis, la formación de túbulos y la morfología celular, nos permite clasificar a los tumores en bien diferenciados, moderadamente diferenciados y mal diferenciados. Las pacientes con alto grado histológico tienen un riesgo relativo de recaída de 4,4 respecto de las que tienen un bajo grado⁷³.

- **Invasión vascular y linfática**

Tiene importancia pronóstica en el riesgo de recaída local y a distancia. En estadios iniciales, la recaída de pacientes con afectación vascular o linfática es del 38% comparado con el 22% en los casos sin dicha afectación⁷⁴.

- **Índice de proliferación**

La actividad proliferativa de las células tumorales está relacionada con el pronóstico. Cuanto más alto es el índice de proliferación tumoral, más agresivo es el tumor y mayores son las posibilidades de producir metástasis a distancia. La determinación del índice de proliferación se realiza mediante diversos procedimientos sobre el tejido tumoral. Estos marcadores incluyen la fracción de células en fase S, el índice de incorporación de timidina, el índice mitótico y el análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos contra antígenos de proliferación como el Ki-67 y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). La citometría de flujo es útil en la determinación de la fracción en fase S y de la ploidía. La estimación de la fase S del ciclo celular permite diferenciar tumores con elevada fracción de células en esta fase, que se correlacionan con los tumores más proliferativos. Existe una relación entre una elevada tasa de mitosis y la presencia de aneuploidía y por tanto de indiferenciación y comportamiento tumoral agresivo. El Ki-67 es un antígeno nuclear presente en las fases proliferativas del ciclo celular (G₁, S, G₂, M) y ausente en la fase de reposo celular (G₀), y es la determinación inmunohistoquímica habitual para conocer el índice de proliferación. También el PCNA, proteína que juega un papel en el inicio de la proliferación incrementando la ADN polimerasa, expresa sus niveles más elevados en fases S, G₂ y M, participa en la síntesis del ADN (ácido desoxirribonucleico), y se

relaciona con los niveles de Ki-67. Existe una correlación muy alta entre la tinción positiva de estos anticuerpos y la determinación de la fase S por citometría de flujo, así como con el índice mitótico y el grado nuclear. Hay estudios que relacionan estos factores con la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama⁷⁵, pero muchos de estos estudios presentan limitaciones por falta de consistencia metodológica y de información respecto a otras variables pronósticas.

- **Receptores hormonales de estrógenos y progesterona**

Son un factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento hormonal. Su presencia suele coincidir con tumores bien diferenciados que presentan un bajo índice de proliferación y se asocian a un mejor pronóstico. Algunos estudios no han objetivado una clara relación con la supervivencia y otros han encontrado una diferencia de supervivencia de 82% a los cinco años si los receptores son negativos frente a 92% si son positivos⁷⁶.

- **Necesidad de nuevos factores pronósticos**

El estadio patológico de la enfermedad asociado a la valoración de determinadas características patológicas, como el tamaño tumoral, la afectación ganglionar, los receptores hormonales, el tipo histológico, el grado y la presencia de invasión vascular resultan esenciales para determinar el pronóstico e indicar el tratamiento en el cáncer de mama. Alrededor del 65% de las pacientes con cáncer de mama se diagnostican sin metástasis ganglionares, evolucionando favorablemente un 70% de ellos después del tratamiento quirúrgico, incluso sin terapia sistémica adyuvante. La identificación del 30% restante, que presentarán recidiva o progresión de la enfermedad y que podrían beneficiarse de tratamientos más agresivos, no se consigue con los factores pronósticos clásicos lo que ha justificado la búsqueda de nuevos factores pronósticos⁷⁷.

Periódicamente aparecen factores pronósticos nuevos de discutida utilidad clínica en Oncología. Las tecnologías implicadas en el desarrollo de éstos, incluyen estudios de fenotipo con técnicas de inmunohistoquímica, detectando productos nucleares o citoplasmáticos relacionados con oncogenes y genes supresores. Diversas

técnicas de biología molecular han sido también aplicadas al estudio en tejidos, analizando directamente el genotipo de la neoplasia. Aunque se han descrito en la literatura más de 100 posibles factores pronósticos, no todos se pueden considerar suficientemente caracterizados o validados.

En general, para establecer la utilidad de un factor pronóstico, éste se debe validar tanto en aspectos técnicos como clínicos. La técnica de estudio debe ser sensible, específica y reproducible, y los resultados deben ser interpretables fácilmente para el clínico. Para ello se requiere disponer de suficientes estudios clínicos con seguimiento de pacientes, metodología superponible y resultados significativos. El factor pronóstico debe identificar subgrupos de pacientes con diferentes probabilidades de recaída, mortalidad o respuesta al tratamiento, independientemente de otros factores.

- **Factores pronósticos moleculares**

Las nuevas técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular permiten profundizar en el conocimiento del fenotipo y del genotipo de las neoplasias, y su correlación con la evolución biológica⁷⁸. La utilización de estas técnicas abre la posibilidad de identificar otros factores pronósticos de marcado carácter molecular. Entre los cambios moleculares más frecuentes detectados en células tumorales se encuentran oncogenes cuya amplificación o sobreexpresión se relaciona con mayor agresividad tumoral (HER, Ciclinas...) y genes supresores como el TP53 y RB, con funciones críticas en el control del ciclo celular, cuyas alteraciones se asocian también a neoplasias más agresivas. Los oncogenes, secuencias del genoma que tienen función reguladora del crecimiento celular, juegan un papel fundamental en la carcinogénesis.

En el cáncer de mama, se puede determinar el grado de expresión o actividad funcional de determinados genes implicados en carcinogénesis, y que pueden tener valor como factores pronósticos. Destacamos los siguientes:

- El protooncogén c-erbB-2 codifica una proteína del receptor del factor de crecimiento epidérmico, y su sobreexpresión es un indicador fiable de pronóstico desfavorable, asociándose a agresividad tumoral, aumento de recurrencias y mortalidad

en pacientes con afectación ganglionar. En pacientes sin afectación ganglionar su influencia es más variable⁷⁹. Tiene una aplicación clínica destacada, pues a su vez es un factor predictivo de respuesta al anticuerpo trastuzumab. Se asocia a ausencia de receptores hormonales y a un mayor índice de duplicación y aneuploidía.

- La uroquinasa activadora de plasminógeno es una serina quinasa que convierte el plasminógeno en plasmina. Se encuentra involucrada en la invasión, degradando la matriz extracelular, requisito para que se produzca la invasión y metástasis. El aumento de sus concentraciones en el cáncer de mama está asociado a mal pronóstico⁸⁰.

- El gen supresor TP53 interviene en el control de la duplicación celular y la apoptosis. Su alteración es el cambio genético más común en los tumores. Su inmunopositividad se considera un factor pronóstico independiente, asociándose con tumores de mayor tamaño y alto grado, y es un indicador de mala respuesta a la hormonoterapia y a un menor intervalo libre de enfermedad⁸¹.

- El oncogén c-myc se expresa con poca frecuencia en tumores mamarios y es un signo de mal pronóstico, su amplificación y la expresión aumentada de la proteína codificada por el gen está relacionada con mal pronóstico tanto en el carcinoma lobulillar como en el ductal. No presenta asociación con otros factores pronósticos. Cuando el gen c-myc no está alterado, la presencia de su proteína se relaciona con una baja incidencia de metástasis en los ganglios axilares⁸².

- El oncogén Bcl-2 está implicado en el control del mecanismo de muerte celular programada o apoptosis. Se relaciona con menor grado nuclear, mayor diferenciación, positividad de receptores de estrógenos y un pronóstico más favorable⁸³.

- El gen del retinoblastoma es un gen supresor con funciones esenciales en el control del ciclo celular. Descrito inicialmente en casos de retinoblastoma ocular, se ha relacionado posteriormente con diversas formas frecuentes de cáncer y algunos autores han asociado alteraciones en su patrón de expresión con el pronóstico del cáncer de mama, relacionándose con grados histológicos más altos y estadios más avanzados de la enfermedad⁸⁴.

- El gen Nm23 se expresa extensamente en tejidos normales así como en células tumorales con capacidad metastásica disminuida. El descenso en la expresión de este gen se relaciona con grados histológicos más agresivos, niveles más bajos de receptores hormonales y presencia de metástasis ganglionares⁸⁵.

- El gen MDR codifica la glicoproteína-P, una proteína transmembrana asociada con la resistencia intrínseca y adquirida frente a ciertos agentes quimioterápicos. Los cánceres de mama que tienden a responder a la quimioterapia, tienen baja expresión de la proteína, mientras que una mayor expresión se correlaciona con una peor respuesta a los agentes quimioterápicos⁸⁶.

- Análisis del perfil de la expresión génica. La expresión de muchos genes puede ser usada como marcador pronóstico. Los microarrays permiten analizar miles de genes, y obtener la llamada firma molecular del tumor basada en la expresión de un número de genes seleccionados, habitualmente entre 50-100. Estudios iniciales han demostrado la asociación de un perfil génico de mal pronóstico en relación con la supervivencia⁸⁷, pero estos datos son preliminares y deben ser confirmados.

Otros marcadores no genómicos que se pueden encontrar alterados en pacientes con cáncer de mama son los siguientes:

- Ciclina E. Regula la transición de la fase G₁ a S, siendo necesaria para la proliferación y diferenciación normal de la mama. Existe relación entre su sobreexpresión y peor supervivencia⁸⁸.

- Catepsina-D. Es una proteasa lisosomal ácida de síntesis estrógeno-dependiente, su positividad se relaciona con la presencia de receptores hormonales y está presente en los tejidos normales y sobreexpresada en algunos carcinomas de mama. Interviene en los procesos de invasión y metástasis y algunos estudios la relacionan con mayor agresividad tumoral y capacidad invasora del tumor por su actividad promotora del crecimiento y proteólisis extracelular. Su valor pronóstico es dudoso⁸⁹.

- Proteína pS2. Está relacionada con el nivel de estrógenos, se relaciona con la angiogénesis y es indicadora de buena respuesta a la terapia hormonal y mayor supervivencia⁹⁰.

- Proteínas de shock térmico: HSP27 y HSP70. Se relacionan con la proliferación celular, diferenciación y angiogénesis⁹¹.

- E-cadherina. Es una proteína de adhesividad intercelular y su expresión se relaciona inversamente con la diferenciación. Su pérdida indica mayor motilidad y agresividad de la célula tumoral⁹².

- Receptor de laminina y colagenasa tipo IV. La detección inmunohistoquímica de ambas proteínas se ha correlacionado con un mayor potencial metastásico en cáncer de mama y en otros cánceres⁹³.

- Detección de micrometástasis. Se basa en el empleo de técnicas de estudio en busca de poblaciones celulares metastásicas poco representadas y no detectables en el examen microscópico convencional, mediante el empleo de estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos anti-queratinas de distinto peso molecular u otros marcadores epiteliales en secciones seriadas de los ganglios linfáticos disecados. Estos pacientes con micrometástasis tendrían mayor riesgo de progresión y una reducción de la supervivencia. Mediante un método inmunohistoquímico similar se pueden detectar micrometástasis en la médula ósea y predecir la recurrencia en estadios iniciales de cáncer de mama y la evaluación y seguimiento de la respuesta a quimioterapia en estadios avanzados⁹⁴.

- **Marcadores tumorales séricos como factores pronósticos**

Aparte de estas alteraciones moleculares comentadas, la mayoría de las cuales no tienen un valor aplicado en la práctica clínica diaria, se han estudiado múltiples sustancias cuya concentración en sangre aumenta en las pacientes con cáncer de mama. Conocidos como marcadores tumorales séricos, y de gran impacto en otros tumores como, tumores germinales, próstata o colon, en el cáncer de mama no han demostrado

un valor contrastado. Los marcadores tumorales se definen como sustancias que se pueden medir cuantitativamente, por métodos inmunohistoquímicos o bioquímicos, en tejidos o fluidos biológicos sugiriendo presencia tumoral. Pueden ayudar a establecer la extensión tumoral, monitorizar la respuesta al tratamiento, predecir el pronóstico y, mediante su monitorización periódica durante el seguimiento de las pacientes, alertarnos ante una posible recidiva de la enfermedad. Además tienen la ventaja de ser objetivos, reproducibles, fáciles de obtener (una muestra de sangre) y en algunos casos coste-efectivos.

Los principales marcadores séricos en cáncer de mama son los relacionados con el gen MUC-1 (como el CA 15.3 y el CA 27.29) y el CEA (antígeno carcinoembrionario):

- CA 15.3: Es posiblemente el marcador más usado en cáncer de mama. Su elevación parece indicar peor pronóstico y puede ser un indicador de recaída. No es muy específico pues se eleva en el 5-6% de personas sanas, y también en otros tumores. En sólo un tercio de las recaídas se eleva el marcador. Su uso en el seguimiento de pacientes con cáncer de mama puede llevar a sobrediagnóstico y demoras en el tiempo. Si el marcador está elevado y no hay confirmación de enfermedad metastásica, la decisión de tratar o no al paciente es difícil⁹⁵.

- CA 27.29: Proporciona similares resultados que el CA 15.3. y parece más sensible⁹⁶ por lo que en algunos países lo ha sustituido.

- CEA: Es uno de los primeros marcadores en ser identificados y caracterizados. Se ha relacionado con mal pronóstico. Y podría ser útil en el seguimiento y en la monitorización del tratamiento. Estudios prospectivos no han validado su utilidad, ni en asociación con otros marcadores como el CA 15.3⁹⁷.

- Otros marcadores como hidroxiprolina, poliaminas, gonadotropina coriónica beta, calcitonina, caseína, proteína del líquido intraquístico son inespecíficos y no tienen ninguna aplicación en el cáncer de mama.

La sensibilidad de los marcadores tumorales séricos en pacientes con cáncer de mama inicial es baja, en torno al 15-35%, y no son útiles para el cribaje ni para el diagnóstico. Niveles bajos en pacientes con sospecha de cáncer de mama no excluyen la presencia de la enfermedad y, por otra parte, altos niveles de un marcador en pacientes con cáncer de mama casi siempre indican la presencia de enfermedad metastásica⁹⁸.

A nivel pronóstico, la presencia de marcadores séricos como CEA y CA 15.3 está relacionada con el estadio tumoral, con el tamaño y la afectación ganglionar. No está claro si estos marcadores son un factor pronóstico independiente.

Las determinaciones de marcadores son útiles en la detección precoz de las recaídas en pacientes con cáncer de mama y sin evidencia de enfermedad. Pueden detectar entre el 40-60% de las recaídas todavía sin evidencia clínica o radiológica de la enfermedad. Su sensibilidad está relacionada con el lugar de recaída. Siendo poco eficaces en las recaídas locorregionales y más útiles en las metástasis a distancia, sobre todo a nivel óseo y hepático. La especificidad de los marcadores para la detección de la recaída en el seguimiento de pacientes sin evidencia de enfermedad es alta, sin embargo su beneficio en términos de supervivencia no está demostrado.

La aplicación principal en pacientes con enfermedad avanzada es la monitorización al tratamiento. Las pacientes que muestran descensos de los marcadores, suelen tener regresión de la enfermedad y a la inversa. Pero, si esta monitorización produce beneficio en supervivencia o en la calidad de vida no está demostrado.

Los datos disponibles en la actualidad resultan insuficientes para justificar el uso sistemático de estos marcadores en cáncer de mama y, aunque un incremento de dichos marcadores puede predecir una recaída, los estudios clínicos no han logrado establecer beneficio en términos de supervivencia, calidad de vida o intervalo libre de progresión. La American Society of Clinical Oncology⁹⁹ considera que hay insuficientes datos para recomendar el uso de marcadores séricos como CA15-3, CA27.29 o CEA para despistaje, diagnóstico, estadiaje o seguimiento del cáncer de mama. Aconseja su uso en la monitorización del tratamiento de la enfermedad en los casos sin lesiones medibles. Otros autores sí que valoran su uso como factor pronóstico, en la detección precoz y en la monitorización del tratamiento en enfermedad avanzada¹⁰⁰.

ÁCIDOS NUCLEICOS TUMORALES Y CÁNCER DE MAMA

- **Estudio de las células tumorales y ácidos nucleicos circulantes**

Las alteraciones genéticas comentadas anteriormente se determinan habitualmente en el tejido tumoral y esto permite junto al diagnóstico anatomopatológico, optimizar la información sobre el tumor en el momento del diagnóstico. En la actualidad, estas alteraciones, que en muchos tipos de tumores pueden ser interpretadas como marcadores genéticos, se pueden detectar en el suero utilizando diversas técnicas moleculares como anticuerpos dirigidos contra moléculas inmunológicamente reconocibles. Sin embargo la limitada sensibilidad y especificidad de estos métodos, ha llevado a la búsqueda de nuevos procedimientos para la detección en sangre periférica de material que fuera representativo del propio material tumoral, como pueden ser el análisis de las células tumorales circulantes y de los ácidos nucleicos, y a su estudio como posibles factores pronósticos. Ambos pueden estar presentes no sólo en pacientes metastáticos sino también en aquellos con enfermedad aparentemente localizada¹⁰¹. Se describe brevemente el papel de las células tumorales circulante y a continuación el de los ácidos nucleicos, sobre el que se centra el presente trabajo.

- **Células tumorales circulantes**

Como sabemos, el desarrollo de metástasis es la primera causa de muerte en pacientes con cáncer. Dado que este proceso requiere el paso de células tumorales con capacidad invasiva por los vasos linfáticos y la sangre, la detección precoz de esas células es de gran importancia en los pacientes con tumores sólidos y tiene grandes implicaciones en el pronóstico y el tratamiento. Dado el número extremadamente bajo de células tumorales circulantes por mililitro de sangre, su detección requiere de métodos altamente sensibles, específicos y reproducibles¹⁰². Se han intentado numerosos métodos de detección de células tumorales en sangre periférica y en médula ósea. Estos métodos se basan en la expresión de genes de células epiteliales y de genes específicos de un tejido como el antígeno prostático específico, la mamaglobina y la tiroglobulina¹⁰³. En el cáncer de mama metastático, el nivel de células tumorales

circulantes puede ser un predictor de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global¹⁰⁴. La proteína mamaglobina, que se expresa en células mamarias y se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama, podría convertirse en una importante herramienta para la detección de micrometástasis circulantes y en médula ósea¹⁰⁵.

Uno de los métodos más fiables para su detección es la inmunocitoquímica. Las técnicas para la identificación de células tumorales circulantes se basan en métodos inmunocitoquímicos que identifican y caracterizan las células tumorales mediante discriminación con citometría de flujo. La determinación de células circulantes tumorales no ha sido desarrollada en la rutina clínica, pese a demostrarse útil como factor pronóstico¹⁰⁶.

Otro método es la técnica de la transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que mide la expresión de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) relacionado con genes específicos del tumor en las células circulantes. Aunque este método permite la detección de una célula maligna entre 1×10^7 células mononucleares, su especificidad está limitada por diferencias cuantitativas en la expresión entre células tumorales y normales. Un ejemplo es la RT-PCR del ARNm del CEA, que parece ser un método aceptable para la detección de células tumorales epiteliales circulantes en sangre periférica y en médula ósea, con posible implicación pronóstica¹⁰⁷.

Más recientemente, se ha desarrollado un método altamente sensible que combina técnicas de citometría de flujo con enriquecimiento inmunomagnético de células periféricas mononucleares, permitiendo la detección de 1 célula en 1 ml de sangre periférica¹⁰⁸.

Estas técnicas mencionadas, permiten detectar células, que asumimos como células tumorales circulantes, basados sólo en la expresión de marcadores de membrana epitelial, lo cual puede hacer dudar de su significado, al carecer de especificidad tumoral¹⁰⁹.

- **Ácidos nucleicos tumorales circulantes**

Otro método distinto, en lugar de la detección de células, se basa en la detección directa de material genético que derive del tumor, extrapolando así la presencia de células tumorales circulantes o al menos, la presencia de material genético del tumor en la sangre de los pacientes. La determinación de secuencias de ADN y ARN similares a las expresadas por las células tumorales es un método que puede indicar la presencia o el paso de células tumorales circulantes¹¹⁰. El estudio de éste método será en el que centraremos este trabajo.

La presencia de ADN circulante en suero o plasma es conocida desde mediados del siglo pasado, y se estudió preferentemente en pacientes con enfermedades autoinmunes y tumorales. Las primeras evidencias del origen tumoral del ADN plasmático encontrado en pacientes con cáncer se producen en la década de los 80. Posteriormente mediante diversas técnicas se ha comprobado que esas alteraciones genéticas encontradas en el ADN circulante son similares a las detectadas en el tumor primitivo, sugiriendo así que el origen del ADN circulante es el propio tumor. Es por tanto posible detectar la presencia de ADN tumoral en una muestra de sangre periférica. Su identificación en el momento del diagnóstico puede tener diferentes implicaciones como monitorización de respuesta a tratamiento, factor pronóstico y método de seguimiento para la detección precoz de una recidiva. Su principal ventaja sería en la detección precoz de una recaída durante el seguimiento. La utilización de la sangre periférica como fuente de ácidos nucleicos tumorales es útil por su accesibilidad, comodidad y la ausencia de efectos secundarios que pueden presentar otros métodos de obtención de material tumoral. Se trata de establecer si puede llegar a ser un buen método de seguimiento, de alteraciones moleculares con implicación pronóstica, a tener presente a la hora de monitorizar determinados aspectos de la enfermedad tumoral.

Aunque nos centraremos solamente en la sangre periférica, la determinación de las alteraciones del material genético de cada tumor se puede estudiar en otros fluidos orgánicos en los que también se expresa como orina, esputo, bilis, heces, y posiblemente saliva.

- **Ácidos nucleicos circulantes y cáncer**

- **Historia y desarrollo**

La presencia de ácidos nucleicos en sangre periférica fue demostrada en 1948 por Mandel y Métais¹¹¹, describiendo ADN y ARN circulante en el suero de individuos sanos y enfermos. En 1966, Tan¹¹² demostró la presencia de ADN en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Posteriormente, se asoció su presencia a enfermedades que conllevan destrucción celular como hepatitis, tuberculosis y cáncer. Más tarde, Leon¹¹³ demostró la presencia de ADN circulante en el suero de pacientes con cáncer con métodos de radioinmunoensayo y, estableció una relación entre falta de respuesta al tratamiento y la persistencia del ADN circulante en la sangre de estos pacientes. En los años 80 surgen las primeras evidencias que demuestran el origen tumoral de dicho ADN¹¹⁴, estos estudios se confirmarán más adelante al observar la similitud de las alteraciones entre el ADN tumoral y el sérico¹¹⁵.

- **Origen de los ácidos nucleicos en sangre periférica**

Aunque parece demostrado que existe ADN circulante tanto en población sana como en pacientes, el mecanismo por el cual el ADN nuclear pierde su confinamiento celular y evita la acción enzimática de las nucleasas séricas, no está completamente aclarado. Son pocos los estudios concluyentes sobre el tema y, las hipótesis suelen basarse en datos indirectos obtenidos durante los estudios de correlación. En los sujetos sanos¹¹⁶, en los que también se puede aislar ADN, pero sin alteraciones, se cree que deriva de células sanguíneas como los linfocitos y otras células mononucleares. Al igual que en los sujetos sanos, cierta cantidad parece provenir de los linfocitos, ya que ADN sin características de ADN tumoral se ha detectado en todos los pacientes estudiados. En los pacientes tumorales¹⁰⁰ la cantidad de ADN plasmático encontrada es más alta, con una media de 180 ng/ml en los diferentes estudios, que en los pacientes no tumorales, controles o con enfermedades autoinmunes, que es aproximadamente 14 ng/ml. La mayor proporción del ADN plasmático aislado en pacientes tumorales deriva, presumiblemente, de algún tipo de células malignas como señalan los estudios tanto cuantitativos como cualitativos antes mencionados, que demuestran que los niveles de ADN circulante no sólo son mayores en pacientes con tumor, sino que además, estos

niveles se correlacionan inversamente con la evolución de la enfermedad y con la respuesta al tratamiento^{113, 117, 118}. Además, la capacidad de detectar pérdidas de heterocigosidad y mutaciones puntuales en genes supresores usando técnicas estándar sugiere que el ADN mutado es el subtipo predominante, al menos en el plasma de algunos pacientes.

Las explicaciones que justifican la presencia de ADN tumoral en sangre periférica son¹¹⁹: a) lisis tumoral: lisis de células tumorales que al alcanzar la circulación son destruidas por el sistema inmunitario; b) necrosis tumoral: tras la que parte del material genético de la célula tumoral puede alcanzar la sangre; c) apoptosis: dado que las características del ADN aislado recuerdan al encontrado en la apoptosis; d) liberación espontánea: los ácidos nucleicos se liberan por un mecanismo activo de la célula, similar al que se produce en la formación de los exosomas, y que se produciría tras la estimulación mitógena de la célula.

La hipótesis más admitida para la explicación de estos procesos de aparición de este ADN es la que relaciona la presencia de ADN tumoral circulante en pacientes con neoplasias con la lisis de células tumorales circulantes o liberadas por el tumor. La presencia de ADN tumoral circulante podría implicar “invasión vascular” por parte de células tumorales. Así, las células derivadas del tumor primario con capacidad invasiva que alcancen el torrente sanguíneo desencadenarían la acción del sistema inmunológico y, la lisis de dichas células, implicaría la consiguiente liberación del contenido intracelular al medio. Diferentes estudios muestran una asociación estadística entre el ADN tumoral circulante y la enfermedad avanzada^{120, 121}. Sin embargo, la controversia sigue abierta ya que esta hipótesis no aclara las elevadas cantidades de ADN plasmático encontradas en algunos pacientes, que únicamente podrían ser justificadas con cantidades mayores de células circulantes de las que habitualmente se han descrito, ya que según algunos estudios publicados la concentración de ADN libre en plasma podría necesitar hasta 1.000 células tumorales circulantes por ml, cifra desproporcionada y que nunca se ha encontrado en pacientes con cáncer^{115, 122}. Además, la presencia de ADN tumoral en el plasma de pacientes de alto riesgo pero sin evidencia de enfermedad tumoral¹²³ y en pacientes con estadios iniciales^{124, 125} tampoco puede ser explicada fácilmente. Así pues, sería lógico asumir que la presencia de ADN tumoral en plasma

podiera deberse a varios mecanismos como necrosis, apoptosis, o bien un mecanismo de liberación activa por parte de la célula tumoral.

La necrosis celular es una de las hipótesis consideradas en el origen del ADN circulante. La teoría viene sustentada por el hecho de que tras la radioterapia, los niveles de ADN circulante se incrementan considerablemente durante los primeros días siguientes al tratamiento¹¹⁸. Además, los niveles séricos de algunos marcadores de muerte celular tumoral, como la lactato deshidrogenasa o la enolasa específica neuronal, se correlacionan directamente con los niveles de ADN circulante¹²⁶. Al igual que la lisis de células circulantes, esta teoría es insuficiente para explicar la detección de alteraciones tumorales en el plasma de pacientes con estadios iniciales o en personas sin evidencia de enfermedad clínica. Los resultados de diversos estudios que demuestran la existencia de alteraciones tumorales en plasma incluso después de la extirpación quirúrgica del mismo¹²⁷, conjuntamente con otros que demuestran la corta vida del ADN libre en el plasma¹²⁸, indican la necesidad de mecanismos adicionales de liberación.

Los mecanismos de apoptosis se admite que pueden estar parcial o totalmente perdidos en células tumorales pero, no obstante es un mecanismo a considerar como fuente de ADN libre en plasma. Existen observaciones a favor de este mecanismo^{122, 129} en las que se demuestra mediante espectrofotometría y microscopía electrónica variaciones entre el ADN plasmático de pacientes con cánceres y el de los controles sanos, a favor de un origen apoptótico.

Otra hipótesis contempla que pueda existir una liberación activa y espontánea de ADN tumoral directamente a la circulación general. Se ha observado que células, e incluso órganos en cultivo, espontáneamente, liberan al medio un complejo nucleoproteico, siendo el ADN su principal componente^{130, 131}. Cultivos linfocitarios estimulados con fitohemaglutinina, producen varias copias de parte de su genoma que excretan al medio^{132, 133}; en cultivos de linfoblastos, se ha demostrado que parte de este ADN liberado al medio lo hace recubierto de muestras de membrana celular que conservan sus propiedades funcionales¹³⁴. En ratones se ha observado que, tras la administración de lipopolisacáridos bacterianos se produce una liberación de ADN al plasma¹³⁵. La explicación de la liberación activa difiere mucho de las anteriormente

descritas ya que, aunque distintas, las otras tres consideran mecanismos de muerte celular, mientras que en esta hipótesis es requisito imprescindible la viabilidad celular y la estimulación mitótica¹³⁶. Aunque actualmente se desconocen las posibles causas biológicas de esta liberación espontánea de ácidos nucleicos al medio extracelular, diversos estudios han demostrado la integración nuclear y posterior expresión de ADN extracelular localizado inicialmente en vesículas apoptóticas o de forma libre en plasma¹³⁷. En base a dichos trabajos se ha hipotetizado la posibilidad de la transformación de células no tumorales mediante este mecanismo. Para que este mecanismo fuese viable, el ADN circulante se debería integrar en el genoma de otras células normales, posiblemente células madre, induciendo su transformación y facilitando así el proceso de expansión tumoral.

○ **Técnicas de estudio de los ácidos nucleicos**

En el manejo analítico del ADN plasmático extracelular con finalidad pronóstica se han usado dos tipos de determinaciones: una se basa en la cantidad de ADN circulante total en los enfermos en comparación con controles sanos y, la otra en la caracterización de este ADN como ADN tumoral. Aquellos estudios que sólo ofrecen información sobre la cantidad de ADN circulante utilizan diversas técnicas como radioinmunoanálisis, PCR semicuantitativa, PCR en tiempo real, cuantificación fluorométrica y espectrofotometría. Todos concluyen que la cantidad de ADN es superior en pacientes con cáncer que en sujetos normales, si bien las cantidades absolutas de ADN varían entre ellos¹³⁸. Los estudios que tratan de caracterizar el ADN circulante como ADN tumoral utilizan la identificación de las mismas alteraciones encontradas en el ADN tumoral en el ADN plasmático extracelular. Estas alteraciones incluyen mutaciones en oncogenes y en genes supresores de tumores, reordenamientos génicos (cadena pesada de inmunoglobulinas), cambios en microsatélites, metilación aberrante del promotor, mutaciones en el ADN mitocondrial, y secuencias de ADN de virus oncogénicos, clásicamente asociados con tumores. Las alteraciones más estudiadas son presencia de mutaciones en genes frecuentemente mutados en tumores, alteraciones en microsatélites como la pérdida de heterocigosidad (LOH) y la inestabilidad de microsatélites (MI), y la metilación aberrante de promotores génicos. Cuando las alteraciones buscadas están presentes en los tumores, éstas se suelen encontrar en una alta proporción, pero debido a la existencia de diversos clones

tumorales, no siempre se mantiene una buena correlación entre las alteraciones del ADN tumoral y del circulante. Los oncogenes más utilizados para estudio son K-ras y N-ras, debido a su amplia presencia en tumores sólidos, aunque también se pueden encontrar en sujetos sanos. Entre los genes supresores se han estudiado TP53 y INK4a por su alta prevalencia en la mayoría de los tumores humanos. Las alteraciones en microsatélites también son estudiadas por su alta frecuencia en tumores y su fácil manejo en el laboratorio. Los microsatélites utilizados son aquellos descritos con más tasa de alteraciones para el tumor en estudio. Los cambios en los patrones de metilación se han asociado con alteración de la expresión de un importante número de genes, siendo INK4a uno de los más estudiados en ADN plasmático¹³⁹.

○ **Utilidad de los ácidos nucleicos tumorales circulantes**

La búsqueda de alteraciones en el ADN circulante compatibles con las del ADN tumoral se ha encontrado en el plasma de pacientes con varios tipos de tumores como mama, colon, páncreas, vía biliar, melanoma, cabeza y cuello, pulmón, riñón, ovario, hígado, uroteliales, estómago, esófago, próstata, cervix y neoplasias hematológicas como linfomas B y leucemia mielomonocítica.

Tras el hallazgo de ADN tumoral circulante en sangre periférica, se planteó cuál podía ser su significación clínica. La presencia de ADN circulante en sangre no puede ser considerada como enfermedad metastásica. Para que una metástasis se desarrolle, células tumorales circulantes deben atravesar la pared vascular, volver a extravasarse e invadir el órgano diana y proliferar. En cada uno de estos pasos, deben evitar la acción del sistema inmune y las condiciones metabólicas adversas. Se estima que sólo una célula entre 10000 células tumorales circulantes es capaz de alcanzar, anclarse y proliferar en otro órgano¹⁴⁰. De hecho, la presencia de ADN circulante no indica, necesariamente, la presencia de células tumorales circulantes. Sin embargo, sí que existen resultados de varios estudios clínicos en los que se observa una relación entre el ADN circulante y algunos indicadores clínicos como la evolución de la enfermedad¹⁴¹. Diversos estudios buscan correlaciones entre el ADN circulante y el diagnóstico y seguimiento¹⁴².

En otros estudios se observa relación entre la persistencia de niveles elevados de ADN tras el tratamiento y posible persistencia de enfermedad, y puntualmente correlaciones con otros marcadores séricos como el CEA en tumores gastrointestinales¹⁴³.

En cáncer de mama se estudia su papel como factor pronóstico¹⁴⁴, y su relación con otros factores pronósticos bien establecidos, como por ejemplo, el estadio patológico, la afectación ganglionar y el tamaño tumoral.

También se ha estudiado su utilidad en la respuesta al tratamiento. Se ha observado una relación entre los niveles de ADN circulante antes y después de la mastectomía, asociándose su presencia con peor pronóstico y con la presencia de enfermedad micrometastásica¹²⁷. Y con la respuesta al tratamiento¹⁴⁵, estudiando su valor como marcador para la monitorización de la eficacia del tratamiento adyuvante.

En la actualidad, los estudios evolutivos con determinación de ADN plasmático que incluyen un número de pacientes adecuado son escasos y con períodos de seguimiento corto para poder obtener resultados consistentes. Su relación con la supervivencia no ha sido todavía probada suficientemente, siendo ésta una de las preguntas que es preciso responder para implicar a este parámetro molecular en el pronóstico de los pacientes con cánceres.

○ **Limitaciones de la técnica**

Como toda técnica, el estudio de los ácidos nucleicos tumorales en plasma y en el tumor no está exento de problemas metodológicos y de interpretación. En la actualidad, estas técnicas no están incorporadas entre las determinaciones rutinarias a nivel hospitalario. En general, hay una falta de protocolización sistemática en el manejo de las muestras, en el método de extracción y en los análisis que hacen los distintos autores que trabajan en este campo. Los autores utilizan diversas técnicas y distintas dianas de estudio. Se usan diferentes métodos de extracción, centrifugación y análisis de los ácidos nucleicos; por ejemplo, algunos autores desechan la primera parte de la muestra extraída para evitar la contaminación por las células de la piel. También existe variación en el material de partida, plasma o suero, si bien este hecho no ha marcado

diferencias en los estudios. Además, los parámetros elegidos para analizar en cada tumor son diferentes, y distintos autores analizan diferentes alteraciones como microsatélites, hipermetilación, mutaciones de TP53, ras o también ADN viral. No conocemos si los resultados son extrapolables entre todas ellas.

La sensibilidad estimada de las técnicas moleculares permite la detección de una célula epitelial entre 10^7 células mononucleares de sangre periférica, si bien esta tasa puede verse limitada por la existencia en tejidos y fluidos orgánicos de sustancias que alteran las reacciones moleculares. La técnica de detección cuantitativa más usada, la PCR en tiempo real, ha permitido el desarrollo de un método de identificación de pacientes con mínimas cantidades de ADN plasmático extracelular con un alto rendimiento. La sensibilidad in vitro de la prueba puede sobreestimar la sensibilidad in vivo, como por ejemplo por la existencia de inhibidores de la PCR presentes en los tejidos y fluidos orgánicos. A veces las alteraciones genéticas y epigenéticas encontradas en el análisis del tumor primario y en sangre periférica pueden no coincidir. Esta heterogeneidad en la expresión puede ser debida a la presencia de diferentes clones de células neoplásicas metastásicas que expresen de manera distinta el marcador a estudio respecto a las células neoplásicas no metastásicas del tumor primario, o bien a los diferentes métodos de preparación de la muestra. También la heterogeneidad de la expresión de los marcadores puede hacer que un determinado marcador no se exprese entre los ácidos nucleicos que han alcanzado la sangre periférica. En la actualidad, no se conoce cual es la vida media del ADN circulante, por lo que el valor de su persistencia está pendiente de ser constatado.

Las cuestiones de la complejidad de la técnica, laboriosidad, lentitud y costo son problemas fundamentales a mejorar para implantar su uso a nivel asistencial.

En general, respecto de los tumores analizados existe una tendencia que se mantiene constante, como es la presencia de ADN en plasma de los pacientes y una cierta correlación pronóstica.

CONSIDERACIONES FINALES

El manejo terapéutico del cáncer de mama es complejo debido a la variabilidad en la evolución de las pacientes. El tratamiento sistémico adyuvante mejora la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. El uso de los factores pronósticos pretende ayudarnos a seleccionar quiénes se pueden beneficiar de dicho tratamiento, con el objetivo de evitar tanto el sobretatamiento a pacientes con bajas probabilidades de recaída, como dejar sin tratamiento a pacientes con riesgo alto de recaída. Aunque la afectación ganglionar axilar es el factor pronóstico más importante, es sólo una medida indirecta que refleja la tendencia del tumor a su extensión. Un tercio de las pacientes con ganglios negativos recidivan, mientras que un tercio de las pacientes con ganglios positivos está libre de recaída tras diez años. Estos datos señalan que los factores pronósticos usados en la actualidad en Oncología, todos ellos indirectos, no predicen con alta especificidad la evolución de un gran número de pacientes, por lo que son necesarios otros factores pronósticos con mayor sensibilidad y especificidad que complementen o sustituyan a los que ya usamos y que, idealmente, reflejen la presencia o ausencia de alteraciones relacionadas con el tumor en la sangre periférica de las pacientes y que puedan tener una relación con su evolución.

Los marcadores tumorales séricos no tienen gran utilidad en el cáncer de mama hasta el momento y su uso no tiene influencia en el manejo de las pacientes. Estos se ven sometidos a una serie de pruebas diagnósticas invasivas durante su seguimiento. La utilización de las muestras de sangre representa una técnica sencilla, cómoda y accesible en el seguimiento de las pacientes.

Los estudios de la presencia de ácidos nucleicos tumorales en plasma o suero han proliferado en los últimos años, aportando datos de pronóstico en un gran número de tumores. La supervivencia, como objetivo prioritario del manejo de los pacientes, es un requisito fundamental a la hora de validar la utilidad de cualquier marcador o factor pronóstico. Los datos de supervivencia son los que podrían hacer que esta técnica se incorporara en el uso clínico rutinario en el manejo de los pacientes.

En este estudio se ha realizado un seguimiento durante cinco años de un grupo de pacientes con cáncer de mama no diseminado en el momento del diagnóstico y se pretende evaluar la supervivencia y su correlación con la detección de ADN tumoral circulante en el momento de la cirugía. Tras la cirugía las pacientes han recibido tratamiento oncológico estándar y han sido seguidas de manera periódica en nuestro Servicio.

Se ha investigado la presencia, al diagnóstico, de ADN con características tumorales en el plasma de este grupo de pacientes con cáncer de mama no metastásico. De las distintas alteraciones moleculares que permiten relacionar el ADN tumoral con el plasmático se han analizado mutaciones en genes supresores (TP53) y pérdidas de heterocigosidad en varias regiones cromosómicas y, se ha correlacionado la distribución de parámetros clínicos y patológicos de la serie de pacientes y su relación con la presencia o ausencia de ADN tumoral en su plasma.

Con los resultados obtenidos se pretende evaluar la supervivencia libre de enfermedad de dicha serie y la supervivencia global, datos necesarios para poder establecer cual es el papel de los ácidos nucleicos circulantes como factor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama. También se analiza su relación con otros factores pronósticos utilizados en la práctica clínica como la afectación ganglionar axilar, el tamaño tumoral y el grado histológico.

Dado que las pacientes han recibido tratamiento adyuvante según el riesgo que presentaban de recaída, definido por los factores pronósticos usados en el manejo clínico de las mismas, se ha estudiado también la relación del ADN plasmático con los distintos tratamientos que han recibido las pacientes y su evolución.

OBJETIVOS

- 1- El objetivo principal del trabajo es investigar si el ADN extracelular en plasma con características de ADN tumoral tiene valor como marcador tumoral en relación con el pronóstico en cáncer de mama.
- 2- Elaboración una base de datos, en la que se incorporen los parámetros clínicos y patológicos de las pacientes al diagnóstico y durante el seguimiento y, que permita un análisis estadístico de correlación con los datos moleculares.
- 3- Elección de unos marcadores moleculares de estirpe tumoral que tengan una alta reproducibilidad en el plasma de las mismas enfermas.
- 4- Caracterización del ADN extracelular aislado de sangre periférica como ADN tumoral en cada paciente y establecer que el plasma es una fuente de ácidos nucleicos tumorales válida.
- 5- Análisis de la capacidad del ADN tumoral libre en plasma como indicador de la tasa de recaídas, de la supervivencia libre de enfermedad y de la supervivencia global de las pacientes incluidas en el estudio.
- 6- Relación del ADN tumoral plasmático con la carga tumoral de las pacientes y con otros factores pronósticos.
- 7- Capacidad de discriminación del ADN plasmático tumoral de subgrupos de peor pronóstico en aquellas pacientes con baja carga tumoral.
- 8- Investigar si este parámetro molecular discrimina subgrupos con diferente respuesta a una misma pauta de tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

SELECCIÓN DE PACIENTES Y PARÁMETROS CLÍNICOPATOLOGICOS

Este estudio prospectivo está basado en un grupo de 147 pacientes diagnosticadas e intervenidas de cáncer de mama por los Servicios de Cirugía y de Ginecología de nuestro centro. Prospectivamente, y de una manera secuencial, reclutamos a las pacientes sin metástasis clínicamente demostradas en el momento del diagnóstico y realizamos un seguimiento periódico. Las pacientes fueron invitadas a participar en este estudio previa información de sus objetivos y firma del preceptivo consentimiento informado.

Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (enmienda de Edimburgo, 2000), siguiendo las Normas de Buena Práctica Clínica de la Conferencia Internacional de Armonización, y cumpliendo la legislación española vigente.

Antes de la evaluación de selección, se informó a las pacientes de la naturaleza del estudio y se les facilitó información pertinente en cuanto a la finalidad perseguida por el mismo. Se explicaron los procedimientos y controles que se llevarían a cabo en el seguimiento, que básicamente no difieren de los que se realizan de forma rutinaria a las pacientes con cáncer de mama. Las pacientes podían abandonar el estudio en cualquier momento, sin perjuicio del tratamiento médico que fueran a recibir en el futuro.

La información necesaria sobre cada paciente (como las iniciales del nombre, dirección, número de teléfono, número de seguridad social e identificación en el estudio) se conservó, de manera confidencial y todo el tiempo que legalmente se estipula, de modo que las autoridades sanitarias pudieran tener acceso a dicha información, en el caso de que fuera necesario, manteniendo confidencial el nombre de las pacientes.

El Comité Ético de Investigación Clínica de nuestro hospital revisó el protocolo final aprobado y el consentimiento informado que se proporcionó a las pacientes. El Comité fue informado periódicamente sobre el progreso del estudio.

Las pacientes debían de cumplir los siguientes criterios de inclusión:

- Consentimiento informado por escrito u oral ante testigos, antes de iniciar los procedimientos específicos del protocolo, incluida la cooperación esperada de las pacientes en el tratamiento, utilización de sus muestras biológicas y el seguimiento.

- Cáncer de mama histológicamente demostrado mediante examen anatomopatológico.

- Las pacientes debían poder someterse a un tratamiento definitivo para su cáncer de mama, que había de ser operable, y éste debía ser la mastectomía o cirugía conservadora de la mama, con disección de los ganglios linfáticos axilares. Los márgenes de la muestra extraída de la cirugía definitiva deberían estar histológicamente libres de tumor invasivo y de carcinoma ductal in situ. El carcinoma lobular in situ no se consideraba un margen positivo.

- Posibilidad de análisis de los receptores de estrógeno y/o progesterona en el tumor primario, así como de la obtención de datos del grado de malignidad, y otros factores pronósticos como p53, bcl-2 y Ki-67.

- No evidencia de enfermedad metastásica en el estudio de extensión previo a la cirugía.

- Normalidad de los parámetros analíticos de hematología, función hepática y renal, que permitieran la administración de tratamiento hormonal, citostático y/o citotóxico.

- Edad >18 años y <75 años.

De octubre de 1997 a julio de 2001, a las pacientes con cáncer de mama que iban a ser operadas en nuestro centro, se les extrajo el día de la intervención quirúrgica, y previamente a ella, 20 cc de sangre periférica y se envió una muestra del tumor extirpado y del tejido mamario normal, desde el Servicio de Anatomía Patológica a

nuestro laboratorio para realizar las determinaciones genéticas en el ADN de las células del tumor, de las células normales y, en el ADN extracelular circulante en el plasma de las pacientes.

Posteriormente las pacientes recibieron el tratamiento adyuvante preciso basado en los estándares internacionales y dentro de los protocolos asistenciales de nuestro Servicio.

El estudio no marcaba ninguna condición a la hora de indicar el tratamiento local o sistémico. La elección de una u otra técnica quirúrgica, mastectomía radical modificada o cirugía conservadora (cuadrantectomía o tumorectomía), dependió de las posibilidades quirúrgicas de cada caso en relación con el tamaño del tumor, su localización, volumen mamario, infiltración de la piel y la decisión de la paciente.

La irradiación postoperatoria sobre el lecho mamario y axila se llevó a cabo en los casos de cirugía conservadora y en las pacientes con tumores con alta probabilidad de recaída local, es decir aquellos con tamaño tumoral elevado, tumores multicéntricos, importante afectación ganglionar y bordes quirúrgicos próximos o afectados. Tras la cirugía, 44 pacientes (30%) recibieron tratamiento con radioterapia por cirugía conservadora o por alta probabilidad de recaída local.

Todas las pacientes, excepto 6, recibieron, además, tratamiento sistémico adyuvante que consistió en la administración de quimioterapia citotóxica o el uso de terapia hormonal tras la cirugía primaria, con el objetivo de eliminar posibles micrometástasis ocultas.

El uso del tratamiento sistémico se indicó a las pacientes con alto riesgo de recaída, que viene marcado por factores de mal pronóstico como la afectación ganglionar axilar, el tamaño tumoral, el grado histológico, la presencia de receptores hormonales y, la edad. Dependiendo de todas estas características se administró quimioterapia, hormonoterapia o ambas. Los regímenes de quimioterapia usados fueron 6 ciclos de CMF (ciclofosfamida oral 100 mg/m^2 durante los primeros 14 días de cada ciclo, metotrexate 40 mg/m^2 intravenoso el día 1 y 8 de cada ciclo y 5-fluoruracilo 600 mg/m^2 el día 1 y 8 de cada ciclo, con una duración de 28 días por ciclo) o 4 ciclos de

AC (adriamicina 60 mg/m² intravenosa y ciclofosfamida 600 mg/m² intravenosa el día 1 de cada ciclo, con una duración de 21 días por ciclo). Un total de 61 pacientes (43%) recibieron quimioterapia. Además, la hormonoterapia se indicó a las pacientes con receptores hormonales positivos, recibíendola 75 pacientes (53%). El tratamiento hormonal se basó en tamoxifeno durante cinco años.

Inicialmente las pacientes, de acuerdo con el tratamiento recibido se dividieron en los ocho grupos posibles: cirugía, cirugía más radioterapia, cirugía más quimioterapia, cirugía más hormonoterapia, cirugía más radioterapia más quimioterapia, cirugía más radioterapia más hormonoterapia, cirugía más radioterapia más quimioterapia y, cirugía más radioterapia más quimioterapia más hormonoterapia. Pero dado que el tratamiento se administró dependiendo de las características clínico-patológicas de las pacientes, éste puede ser considerado como un factor pronóstico en relación con la progresión de la enfermedad y, por este motivo, para el análisis estadístico, las pacientes se agruparon en varios subgrupos tal y como se detalla más adelante en el apartado de Resultados.

Una vez finalizado el tratamiento todas las pacientes realizaron un seguimiento periódico, en nuestro Servicio durante una media de 58 meses, cuyo objetivo era la detección precoz de las condiciones curables o que pudieran beneficiarse de la administración inmediata de un tratamiento y la satisfacción psicológica de la paciente al sentirse incluida en un protocolo de seguimiento médico. El seguimiento se inició a los tres meses de la finalización del tratamiento, y se realizó cada tres meses durante el primer año, cada seis meses durante el segundo año y anual a partir de entonces hasta la recaída, en caso de producirse, o hasta el éxitus. El seguimiento se basó principalmente en la mamografía anual y exploración clínica. Pero dependiendo de las particularidades de cada tumor y la situación clínica de las pacientes, se realizaron exploraciones complementarias añadidas, analíticas, radiografía de tórax, ecografía abdominal o estudio gammagráfico óseo, así como otra serie de pruebas más específicas dependiendo de las localizaciones para descartar recaída de la enfermedad cuando ésta era sospechada.

De las historias clínicas se recogieron los datos médicos de todas las pacientes: fecha de nacimiento, tamaño tumoral, afectación axilar, presencia de receptores de

estrógeno y progesterona, situación menstrual, estadio tumoral, tipo histológico, grado histológico, índice de proliferación, c-erbB2, bcl-2, invasión vascular, tratamiento sistémico administrado, fechas de diagnóstico, recurrencia y muerte, cuando procedía, y situación en la última visita. Para la determinación del estadio tumoral se usó la clasificación TNM. El grado histológico de los tumores se estableció de acuerdo con la clasificación patológica de Bloom-Richardson. Se determinó la expresión de los receptores hormonales, el índice proliferativo Ki-67, bcl-2 y c-erbB2 mediante procedimientos inmunohistoquímicos. Cuando fue necesario para una mayor seguridad diagnóstica c-erbB2 también se determinó mediante técnicas de inmunofluorescencia de hibridación in situ (FISH).

La supervivencia global fue el objetivo principal del estudio y se definió como el periodo desde el diagnóstico hasta la fecha de la última revisión o del fallecimiento de la paciente, fuese ésta por progresión tumoral o no. También se analizó la supervivencia libre de enfermedad, definida como el intervalo entre la fecha del diagnóstico y la primera recaída y, el número aislado de recaídas. Para establecer la utilidad pronóstica del ADN tumoral plasmático y valorar su posible utilización en la clínica, se analizó su relación con otros factores pronósticos para determinar si en los estadios más iniciales, en pacientes con baja carga tumoral (sin afectación axilar y T1-T2) es capaz de discriminar grupos de peor pronóstico que se pudieran beneficiar tratamiento adyuvante. Se estudiaron las diferencias en las pacientes con o sin afectación linfática axilar, tamaño tumoral y grado histológico y, su relación con la supervivencia. Se valoró la evolución de las pacientes según el tratamiento recibido.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El ADN para el análisis molecular fue extraído del tumor y del correspondiente tejido normal, de linfocitos y del plasma. Se utilizaron como marcadores para caracterizar el ADN seis microsátélites y mutaciones en TP53. Se comenzó con la extracción de ADN mediante un método no orgánico. El plasma fue purificado en columnas Qiagen. Tras calentar la muestra y centrifugarla, el sobrenadante se trató con proteinasa K y buffer AL y se incubó. Para la amplificación de los fragmentos a estudiar se usó la técnica de PCR y los alelos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. La intensidad de las bandas alélicas fue detectada mediante tinción de plata y analizada por densitometría. Para el estudio mutacional de TP53, se amplificaron los exones 5, 6, 7 y 8 mediante PCR-SSCP (polimorfismos conformacionales de cadena simple). Las muestras que presentaron una banda diferencial en la SSCP fueron amplificadas nuevamente y secuenciadas. Figura 1.

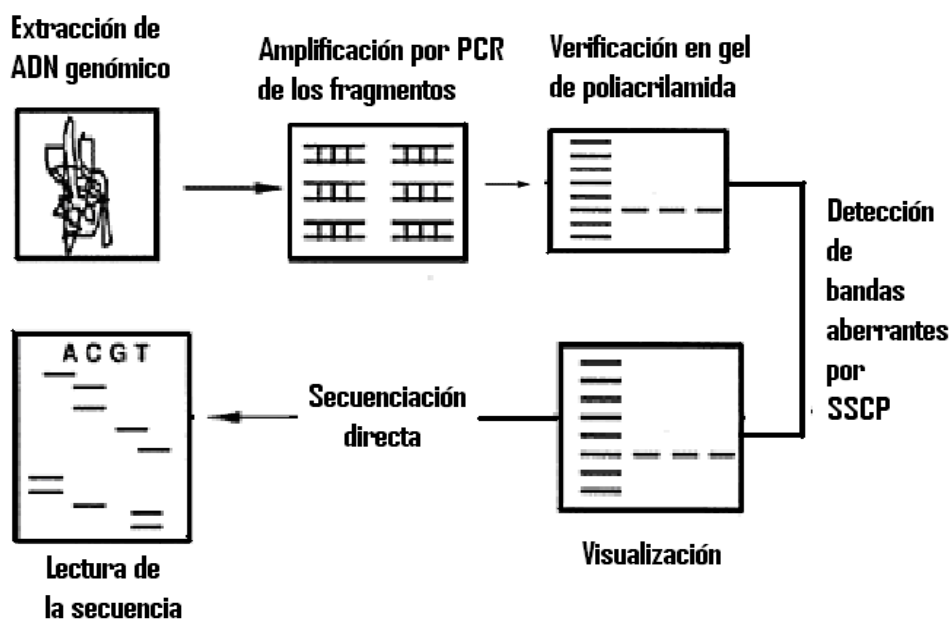


Figura 1: Esquema del protocolo experimental.

En los siguientes puntos se desarrollan con detalle los diferentes pasos realizados en el estudio.

EXTRACCIÓN Y MANEJO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se obtuvieron muestras de tejido mamario tumoral y sano inmediatamente tras la intervención quirúrgica, y éstas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron examinadas patológicamente para confirmar el diagnóstico de carcinoma de mama. Se obtuvieron muestras de sangre periférica (20 mililitros) de cada paciente mediante venopunción el día de la cirugía. A su vez se extrajeron muestras de sangre periférica a 35 donantes sanos procedentes del Banco de Sangre de nuestro hospital. El ADN se extrajo de las muestras de tejido mamario tumoral y sano y de las células mononucleares de sangre periférica (que fue usado también como ADN control que pudiera poner de manifiesto posibles alteraciones moleculares en el tejido mamario normal) mediante métodos no orgánicos (S-4520 kit, Oncor Inc., Gaithersburg, MD).

La extracción de ADN del tejido crioconservado se realizó con aproximadamente 30 mg de tejido normal y tumoral de cada paciente. Este fue disgregado mecánicamente en presencia de buffer de lisis (NaCl 100 mM, EDTA- Na^2 25mM, TrisHCl 10 mM, SDS 0.5 mM) y proteinasa K (0.5 mg/ml). Se mantuvieron en un bloque térmico a 55°C durante 5 horas, en las cuales se agitaban esporádicamente para agilizar la lisis de proteínas y ácidos grasos. Tras la digestión se añadían 0.5 volúmenes de NaCl 5 M, para lograr un gradiente de densidad, se agitaban y se centrifugaban a 14.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, tiempo en el que precipitaban todos los restos celulares. Al sobrenadante recuperado se le añadía 1 volumen de isopropanol al 80% y a -20°C , en estas condiciones y después de agitar las muestras por inmersión se lograba la precipitación del ADN en forma de medusa. Esta medusa era lavada en etanol al 70% y diluida en 0.5 ml de H_2O bidestilada, una vez seca.

Para la obtención del plasma se centrifugaron 10 mililitros de sangre periférica anticoagulada con EDTA a 2.500 revoluciones por minuto durante 15 minutos. El ADN plasmático se purificó mediante columnas Qiagen (QIAmp Blood Kit: Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo protocolo de sangre y fluidos orgánicos, introduciendo las siguientes modificaciones. Entre 7.5 y 12 mililitros de plasma se calentaron a 99°C

durante 5 minutos, después se centrifugo a 14.000 revoluciones por minuto durante 30 minutos y el sobrenadante, aproximadamente 1 mililitro, fue incubado con Proteinasa K y buffer AL (Qiamp Blood Kit, Qiagen, Hilden, Germany) a razón de 10 a 1, toda la noche a 55°C. Una columna se usó repetidamente hasta que toda la muestra fue procesada.

El ADN extraído fue cuantificado por espectrofotometría. Las concentraciones de los ácidos nucleicos logrados en cada extracción fueron calculadas midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (CECIL CE 2040), donde se consideró que una absorbancia de una unidad correspondía a 50 µg de ADN por ml. De cada una de las muestras se prepararon diluciones a 50 ng/µl, las cuales fueron posteriormente usadas en las reacciones de PCR. La calidad de cada una de las extracciones se calculó mediante el cociente de absorbancia a 260 nm/absorbancia 280 nm, para comprobar que la presencia de proteína en las extracciones no superaba la cantidad recomendada; así, en todas las muestras utilizadas el valor de ese cociente oscilaba entre 1.6 y 1.8, el cual es considerado óptimo para muestras diluidas en agua.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Es un método “in vitro” descrito por Saiki¹⁴⁶ en 1988 que permite la amplificación casi exponencial de pequeñas cantidades de ADN genómico hasta niveles fácilmente detectables por técnicas convencionales como la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida.

La técnica está basada en la repetición cíclica de una serie de procesos predeterminados de desnaturalización, apareamiento de oligonucleótidos iniciadores o cebadores de la reacción a la molécula de ADN y elongación del fragmento deseado. Para la reacción son necesarias además de la existencia de ADN genómico o ADNc la presencia de la enzima ADN polimerasa, cada uno de los cuatro dNTP en cantidades equimolares y una pareja de oligonucleótidos complementarios a los extremos de ADN que se desea amplificar, así como cierta concentración de iones como el magnesio que actúan como cofactores de la propia polimerasa además de estabilizar el resto de reactivos. Todas las reacciones se llevan a cabo en aparatos que someten a las muestras a ciclos de tiempo y temperatura específicos de cada uno de los procesos anteriormente señalados, denominados termocicladores.

En nuestro caso se utilizaron los modelos de termocicladores 2400 y 9700 de la casa comercial Perkin Elmer (Perkin-Elmer, Cetus, Foster city, CA) y el kit AmpliTaq Gold with GeneAmp (Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, NJ). Para la amplificación de los diferentes fragmentos se utilizaron 100 ng de ADN genómico, con la salvedad del ADN procedente del plasma, en cuyo caso se utilizaron directamente 6 µl del producto de extracción. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen de 25 µl donde las concentraciones finales de cada uno de los reactivos fueron: dNTPs 200 µM (Promega Corp., Madison, WI), 0.6 µM de cada uno de los oligonucleótidos, y diferentes concentraciones de cloruro magnésico, dependiendo del cebador utilizado, 0.75 unidades de AmpliTaq Gold DNA polimerasa y buffer PCR 1x.

Cada una de las muestras fue sometida a un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 10 minutos, seguido de treinta ciclos, cada uno de los cuales constaba a su vez de: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, cuarenta segundos para que se

produzca la unión específica de cada cebador con su hebra complementaria, a la temperatura específica de cada uno de ellos, y elongación final a 72°C durante 30 segundos. Finalmente se sometieron a un ciclo de elongación a 72°C durante 12 minutos.

ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis de los productos de PCR se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida (BioRad, Hercules, CA) no desnaturizante de radio 29:1, polimerizados a temperatura ambiente con 50 µl de persulfato amónico al 25% (Boheringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) y 55 µl de TEMED (N,N',N',N'-tetramatiletlen-díamida) (Amresco, Solon, Ohio) en cubetas de electroforesis verticales de 18 x 24 cm de tamaño y 0.75 mm de espesor (BioRad, Hercules, CA). Los geles así preparados fueron recorridos durante 20 minutos a 600 voltios y cargados posteriormente con los productos de PCR.

Bajo estas condiciones las moléculas de acrilamida-bisacrilamida polimerizan en largas cadenas formando un gel poroso, cuyo tamaño de poro variará en función del porcentaje de acrilamida incluida en él. Por otro lado, el campo eléctrico aplicado al gel crea una diferencia de potencial que literalmente arrastrará las moléculas de ácidos nucleicos, de carga neta negativa debido a la presencia del esqueleto de grupos fosfato, hacia el polo positivo. En este proceso se separarán las muestras en función del tamaño o de su estructura secundaria, al ser frenadas de manera diferencial en su avance por la red de acrilamida-bisacrilamida.

Los geles de acrilamida se utilizaron para los análisis de pérdidas de heterocigosidad. Los productos de PCR eran cargados en los geles de electroforesis junto con el buffer de carga (0.0002% xilencianol y 0.0002% azul de bromofenol) sin previa desnaturización de las muestras, con lo que el ADN migraba a lo largo del gel en su forma bicatenaria. En estas condiciones, los fragmentos amplificados de ADN no forman estructuras secundarias complejas y van a migrar a lo largo del gel a una velocidad determinada en función del número de pares de bases de que estén formados. De esta manera se puede distinguir un alelo de procedencia paterna del de procedencia materna si existe una diferencia de tamaño entre ambos, característica en la que se apoya el uso de marcadores polimórficos de tipo microsatélite.

En la técnica de la SSCP los productos de PCR son mezclados con un buffer de carga que incluye un 98% de formamida, un agente desnaturizante, posteriormente

son sometidos a una desnaturalización térmica, para lo que son calentados hasta los 98°C durante 5 minutos. En este proceso se produce el desapareamiento de las hebras complementarias debido a la rotura de todos los puentes de hidrógeno que mantenían unidas las bases nitrogenadas. Transcurridos los cinco minutos mencionados se introducen rápidamente en hielo durante tres minutos; esta brusca bajada de temperatura hace que las hebras monocatenarias de ADN se plieguen sobre sí mismas y formen puentes de hidrógeno intracatenarios, más o menos estables, al no dar tiempo material a que cada hebra aparezca nuevamente con su cadena complementaria. Esto se traduce en la formación de una estructura secundaria compleja que va a depender directamente de la secuencia de nucleótidos de la misma y que finalmente va a determinar la velocidad a la que emigran a lo largo de los geles de acrilamida. Obviamente, cualquier cambio en la secuencia nucleotídica debería tener su reflejo en la estructura secundaria que formen los fragmentos amplificados, resultando en un cambio en la movilidad electroforética con respecto a fragmentos de secuencia conocida y considerados normales.

Después de las electroforesis los productos de PCR se visualizaron con un método de tinción no radioisotópica basada en oxidaciones-reducciones de los fragmentos de ADN embebidos en el gel de acrilamida y tinción con plata. En el proceso se llevan a cabo los siguientes lavados: 10 minutos con etanol al 10% como fijador; 3 minutos con ácido nítrico al 1% como oxidante; tras dos lavados rápidos en agua destilada el gel se tiñe durante treinta minutos en una solución de nitrato de plata 12 mM; se vuelve a lavar dos veces para retirar el exceso de plata y se revela con una solución de carbonato sódico 0.5 M y formaldehído al 0.05%. Cuando las bandas están teñidas el gel se lava con una solución de ácido acético al 10% para detener la reacción de revelado. Tras el revelado los geles fueron plastificados para su conservación y posterior análisis. Con esa técnica los productos de PCR son detectables con luz visible. La intensidad de las bandas obtenidas fueron analizadas por densitometría, para ello las imágenes fueron capturadas con un densitómetro GS-690 Imaging Densitometer, digitalizadas a 400 dpi y analizadas con el programa Multi-Analyst/PC.

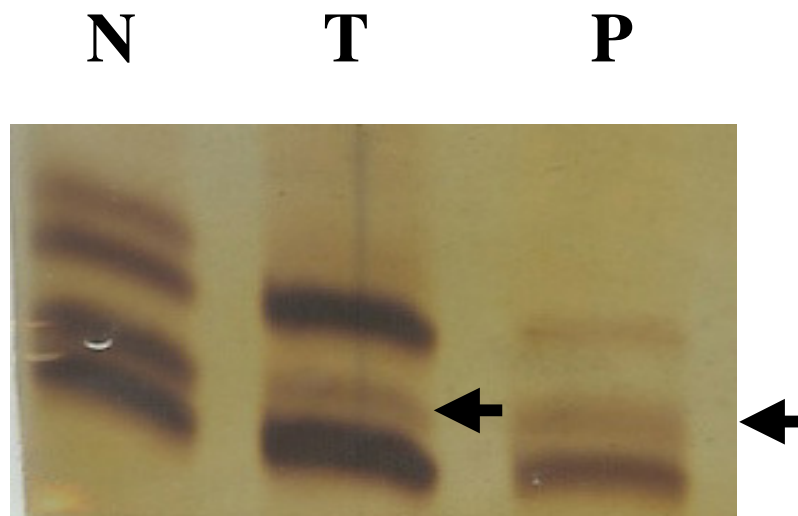


Figura 2: Imagen tomada con luz normal de un gel de electroforesis teñido con plata. La figura muestra una LOH en la región 17q21 (microsatélite D17S855) en el ADN extraído tanto del tejido tumoral (T) como en el ADN extraído del plasma (P). En la primera columna se representa tejido normal (N). Las flechas señalan el alelo perdido.

GENÉTICA DEL CÁNCER DE MAMA Y MUTACIONES DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES TP53

En la transformación maligna de las células se produce una acumulación de alteraciones genéticas que incluyen inactivación de genes supresores de tumores y activación de oncogenes. El cáncer de mama, como otros tumores malignos, progresa por la acumulación de una serie de cambios genéticos y fenotípicos en las rutas que regulan la proliferación, diferenciación, muerte celular por apoptosis o necrosis, reparación del ADN, compartimentalización tisular y respuestas al tratamiento. Las alteraciones genéticas somáticas más frecuentes encontradas en el cáncer de mama son las amplificaciones de ADN (en oncogenes o en genes que codifican para factores de crecimiento o sus receptores) y mutaciones y pérdida de heterocigosidad (LOH) que inactivan genes supresores. La detección de estos cambios genéticos ha supuesto un potencial diagnóstico y pronóstico para el cáncer de mama.¹⁴⁷

Las amplificaciones en el cáncer de mama se han encontrado en más del 15% de los tumores, y los principales genes implicados, hasta la fecha, son los que codifican para los receptores del factor de crecimiento HER2/neu (c-ERB2), los factores de transcripción nuclear c-MYC y AIB-1 y para la quinasa reguladora del ciclo celular CCND1.

Los estudios en el síndrome hereditario de predisposición al cáncer del retinoblastoma permitieron a Knudson¹⁴⁸ formular la teoría de los “dos golpes” de los genes supresores de tumores. Harris¹⁴⁹ demostró que ciertos cromosomas podían suprimir el crecimiento celular *in vitro*. Esto permitió la descripción de los genes supresores de tumores y de su modo de actuación, de forma recesiva, inactivándose cuando ambos alelos están alterados.

En contraste con otros tumores epiteliales, el cáncer de mama se caracteriza por inestabilidad cromosómica, en lugar de mutaciones puntuales, siendo las mutaciones de TP53 probablemente un evento tardío en la historia natural del cáncer de mama. Las anomalías genéticas más comunes encontradas en el cáncer de mama familiar y esporádico parecen ser la LOH en múltiples loci. En la actualidad, además de la LOH

del gen TP53 y las mutaciones de BRCA1 y BRCA2, se han descrito LOH en los locus 13q, 9p, y 16q que afectan a los genes supresores de tumores RB-1, CDKN2 (codifica la proteína p16) y CDH1 (codifica la proteína E-cadherina) respectivamente. RB-1 y CDKN2 regulan el ciclo celular y CDH1 regula la diferenciación y la compartimentalización tisular. Otros genes implicados en la progresión del cáncer de mama residen en los cromosomas 1p, 3p, 6q, 7q, 11p, 11q, 15q, 17q, y 22q. La incidencia estimada de la afectación de los genes supresores de tumores es del 30-40% para TP53, del 15-20% para RB-1, del 20-30% para CDKN2 y del 20-30% para CDH1. Los genes supresores de tumores parecen actuar en las siguientes principales vías: como antiproliferativos, como inductores de los genes reparadores del ADN y como promotores de la diferenciación celular. BRCA1 y BRCA2 juegan un papel directo en la reparación del ADN, la proteína ATM detecta daño en el ADN y transmite la señal a las proteínas BRCA, mientras que otras múltiples proteínas como Rad51 y p53 están también implicadas en estas vías. E-cadherina aísla a la proteína β -catenina (factor proliferativo) ayudando a mantener la diferenciación del epitelio mamario; p53, induciendo p21, también inhibe la proliferación, mientras que p16 inhibe el ciclo celular; las proteínas p53 y p16 promueven la fosforilación y la inactivación de pRb al bloquear el ciclo celular en G₁ y el paso de G₁ a la fase S. PTEN controla la proliferación y la supervivencia celular mediante mecanismos de fosforilación en G₁. Aparte de los comentados, se han propuesto otros muchos genes supresores de tumores.¹⁵⁰

El estudio de TP53 ha tenido un papel muy relevante en la comprensión de la biología del cáncer y sus mutaciones son las anomalías genéticas que se detectan con más frecuencia en las enfermedades malignas. Las mutaciones del gen TP53 constituyen la anomalía genética más frecuente del cáncer de mama. Este gen está implicado en el control del ciclo celular, reparación de ADN y diferenciación celular. TP53 se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17, en la banda 17q13.15, está compuesto por 11 exones y 10 intrones. Codifica una proteína de 53 Kda formada por 393 aminoácidos, de vida media inferior a media hora, que funciona en la reparación del ADN, por lo que se la denomina “el guardián del genoma”. p53 actúa mediante interacciones con otras proteínas y como reguladora de la transcripción. Interviene como controladora del ciclo celular durante las fases G₁/S y G₂/M enlenteciendo el crecimiento de la célula y promoviendo la reparación del daño sobre el ADN y, si el

daño es muy severo para ser reparado, promueve la muerte celular mediante la apoptosis. La mayoría de las mutaciones del gen TP53, en pacientes con carcinoma mamario, ocurren en una región del gen muy conservada evolutivamente que comprende los exones 5 al 8. Cuando la mutación aparece en la secuencia codificante del gen, la proteína resultante pierde su capacidad de regulación del crecimiento celular y la célula adquiere características más agresivas que se ven reflejadas en los tumores. No está del todo aclarado qué eventos moleculares inducen a la proteína p53, sin embargo, es conocido que la radiación ultravioleta y las roturas de la doble cadena de ADN son potentes inductores de la estabilización de p53 a través de una proteína quinasa dependiente de ADN y de la proteína inducida por el gen ATM. ATM es una proteína implicada en la transducción con alta afinidad por PI3K. Inhibidores de la proteína quinasa C, o fosfatasa serina-treonina, y la adenosina monofosfato cíclica pueden prevenir las respuestas mediadas por p53. p53 induce la paralización del crecimiento celular, en parte a través de la inducción de p21, y de ese modo la inhibición de la ciclina E-CDK2 catalizadora de la fosforilación de pRb. p53 induce la transcripción de genes reparadores del ADN, incluyendo la ciclina G, ERCC, y Gadd 45.¹⁵¹

Los reguladores negativos de TP53 son la fosforilación por varias quinasas, acetilación por histonas, su exclusión nuclear y, la más importante, su degradación a través de una ligasa denominada MDM-2 (murine double-minute gene-2).

El estudio de las alteraciones de TP53 es laborioso debido a la presencia potencial de mutaciones a lo largo de varios exones. A pesar de esto, numerosos grupos han investigado las mutaciones de TP53 en DNA sérico y plasmático, probablemente debido a la prevalencia de alteraciones de TP53 en la mayoría de los tumores. Su estudio se ha realizado mediante SSCP seguido de técnicas de secuenciación, y en general el estudio de las mutaciones en plasma se han asociado al análisis de otras alteraciones.

En cáncer de mama, los estudios que analizan mutaciones de TP53 en plasma como único marcador son muy escasos. La mayoría de los estudios han analizado mutaciones de TP53 en plasma o suero junto con otros marcadores como hipermetilación o alteraciones de microsatélites. En estos estudios los datos han sido

evaluados con respecto al total de los parámetros analizados, y las conclusiones del valor aislado de TP53 no han sido frecuentes. En diversos estudios, los rangos de detección de TP53 fueron de 37% en cáncer de pulmón, 5% en cáncer de mama, 21% en cáncer colorrectal y 18% en cáncer de cabeza y cuello. En los estudios la sensibilidad de la detección en plasma o suero estuvo entre el 25% y 85%. Sin embargo, está claro, según los datos de la sensibilidad y los rangos de detección global que, a pesar de la alta prevalencia de las alteraciones de TP53 en los tumores humanos, el análisis de las mutaciones de TP53 en plasma o suero es técnicamente dificultosa y probablemente no suficiente por sí sola con fines pronósticos. El hecho de que mutaciones de TP53 se encuentren en el 30-40% de las pacientes con cáncer de mama, sugiere que puede ser un marcador útil¹¹⁰.

PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD

Se entiende por pérdida de heterocigosidad la pérdida de un segmento cromosómico y en consecuencia de la capacidad de codificación de información que contenía, involucrando en muchas ocasiones a varios genes. La LOH es una alteración genética asociada a la inactivación de genes supresores, por lo que la búsqueda de las mismas sirve de base para la identificación de genes supresores claves para el desarrollo del cáncer. Además, muchas de estas alteraciones están asociadas con las formas más agresivas del tumor, y por tanto tienen en esas ocasiones un importante valor pronóstico. Para el análisis de estas pérdidas alélicas en las diferentes regiones nos hemos apoyado en la existencia de secuencias tipo microsatélite.

Los microsatélites son secuencias de ADN de longitud variable formadas por repeticiones en tándem de una secuencia corta de nucleótidos, habitualmente entre 1 a 4. Con cebadores adecuados es posible amplificar fragmentos de ADN que pueden ser usados como marcadores de microsatélites, y con un panel de dichos marcadores, se puede estudiar su estado en los tumores. Cambios genéticos característicos en el tejido tumoral, en este caso las alteraciones de microsatélites, son detectables en el ADN plasmático. Los microsatélites más utilizados para los estudios de LOH son los formados por repeticiones del dinucleótido CA (TG en la hebra complementaria). Estos microsatélites son muy comunes, representando un 0.5% del genoma.

Cuando estos marcadores ofrecen variabilidad en cuanto al número de repeticiones en un locus en concreto se dice que son polimórficos, siendo cada una de las posibilidades una variable polimórfica. La presencia de dos variables en un mismo individuo permite diferenciar ambos alelos en una electroforesis en geles de acrilamida y a su vez permite compararlos entre diferentes tejidos (normal versus tumoral). Un individuo portador de dos variables polimórficas se denomina heterocigoto o informativo, mientras que, cuando en la región cromosómica analizada se presenta el mismo número de unidades repetitivas en ambos alelos se dice que este individuo es homocigoto o no informativo, ya que no va a ser posible distinguirlos.

Debido a que estas secuencias son altamente polimórficas, son muy utilizadas en estudios de ligamiento para la localización de genes relacionados con enfermedades, estudios de segregación alélica e identificación de los individuos susceptibles de desarrollar una enfermedad en familias con síndromes hereditarios.

Las diferentes bandas alélicas detectadas tras la electroforesis fueron analizadas por densitometría, siendo capturadas en un densitómetro de imagen, GS-690 Imaging densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), digitalizadas a 400 dpi y analizadas con el software Multi-Analist/PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Un alelo debe considerarse perdido cuando su señal se reduce el 100% con respecto a lo observado en su homólogo en el tejido normal. Sin embargo, son aceptadas pequeñas variaciones en estas cantidades debido a problemas intrínsecos a la técnica de amplificación por PCR, como la presencia de pequeñas cantidades de células normales entre el tejido tumoral, o en este estudio, del ADN de las células mononucleares, pudiendo ser el resultado de la expresión de diferentes intensidades de banda aún en situaciones de total ausencia de un alelo. Por eso, en el estudio se va a considerar que existe LOH cuando la señal del alelo se reduce más del 75% respecto a su observación en condiciones normales.

Con el uso de los microsatélites se puede estudiar igualmente el fenómeno denominado inestabilidad de microsatélites. Este evento genético es la consecuencia de la existencia de anomalías en el sistema de reparación de fallos de apareamiento en la doble hebra de ADN conocido como MMR (Miss-Match Repair), que se caracteriza por una elevada acumulación de mutaciones y alteraciones en la longitud de los microsatélites de ADN. Se detecta como un cambio en la movilidad electroforética de los productos de PCR, al menos de alguno de los alelos amplificados debido a ese cambio de tamaño. Esta alteración no implica la pérdida de regiones y por tanto la delección e inactivación de ningún gen. A pesar de que la MI es rara en cáncer de mama, se estudió su presencia en el análisis de los microsatélites, pero sólo se consideró LOH porque la MI no se detectó en ADN tumoral.

CARACTERIZACIÓN DEL ADN PLASMÁTICO

- **Análisis de microsatélites**

Como primer estudio molecular se analizó LOH usando 6 marcadores de microsatélites en los cromosomas 17, D17S855¹⁵² y D17S654¹⁵³; 16, D16S421¹⁵⁴; 11, TH₂¹⁵⁵; 10, D10S197¹⁵⁶; y 9, D9S161¹⁵⁷. Estos marcadores fueron escogidos porque muestran una alta tasa de alteraciones en cáncer de mama. La amplificación del ADN fue realizada por PCR convencional en las muestras de ADN plasmático y de tejido tumoral y sano. La PCR se realizó en volúmenes de 25 µl usando 100 ng de ADN como muestra patrón, 0.75 unidades de Ampli Taq Gold DNA polimerasa (Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, NJ), 2.5 µl de 10 X PCR buffer, 200 µM deoxinucleótido trifosfato, 0.6 µM de cada cebador, y un rango de concentraciones de cloruro de magnesio, dependiendo del marcador polimórfico. Se realizó una amplificación a 40 ciclos en un termociclador (Perkin-Elmer, Foster City, CA) para ADN plasmático, y a 30 ciclos para el resto de las muestras (tejido mamario normal y tumoral y el ADN de las células mononucleares de sangre periférica). Los alelos fueron separados mediante la mezcla de 25 µl de producto PCR con 10 µl de buffer, 0.02% xylene cyanol, y 0.02% de bromfenol azul. La electroforesis se realizó mediante gel de poliacrilamida desnaturalizado al 8-12% durante 12-15 horas a 500 V. Tras la electroforesis, la intensidad de banda alélica se detectó mediante tinción de plata y medida por densitometría. La imagen del gel fue capturada por densitometría y analizada según se ha mencionada previamente.

- **Análisis de mutaciones del gen TP53**

El segundo análisis molecular usado para la caracterización del ADN tumoral plasmático, realizado mediante SSCP de acuerdo con la modificación del método realizada por Orita¹⁵⁸, fue la presencia de mutaciones en los exones conservados de TP53; se amplificaron los exones 5, 6, 7 y 8. Los cebadores usados fueron: exon 5, 5'-TCCTTCCTCTTCCTACAG y 5'-ACCCTGGGCAACCAGCCCTGT; exon 6, 5'-ACAGGGCTGGTTGCCAGGGT y 5'-AGTTGCAAACCAGACCTCAGGCG;;

exon 7, 5'-TCCTAGGTTGGCTCTGACTGT y 5'-AGTGGCCCTGACCTGGAGTCT ; y exon 8, 5'-GGGACAGGTAGGACCTGATTTTCCTT y 5'-ATCTGAAGGCATAACTGCACCCTTGG. Las temperaturas de emparejamiento fueron 65°C, 67°C, 62°C y 68°C, respectivamente. La PCR se realizó bajo condiciones estándares en un volumen de 25 µl que contenían 2 µl (100 ng) de ADN de muestra patrón (tumoral, normal o ADN plasmático); 2.5 µl de 10X buffer PCR y 0.75 unidades de Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems, Inc.); 200 µM de mezcla de deoxinucleótido trifosfato; 0.6 µM de cada cebador; clorhidro magnésico en un rango de concentraciones dependiendo del cebador; y el agua destilada necesaria para alcanzar el volumen total. Mediante amplificación por PCR, las muestras se procesaron a 40 ciclos de 94°C durante 1 minuto para ADN plasmático y a 30 ciclos para el resto de las muestras. Luego se sometieron a un rango de temperaturas de emparejamiento, dependiendo del cebador, y finalmente a 70°C durante 1 minuto. Los productos amplificados fueron desnaturalizados mezclándolos con 15 µl de solución stop desnaturalizante que contenía formamida 98%, 10 µM edatamilo (pH 8.0) 0.02% xileno cianol, y 0.02% de bromofenol azul; calentado a 95°C durante 5 minutos; y rápidamente enfriado en hielo. La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida desnaturalizado al 8-12% durante 12-15 horas a 250 V. La intensidad de banda alélica en los geles se detectó mediante un método no radioisotópico, usando tinción de plata. Las muestras que mostraban una banda diferencial en el polimorfismo conformacional de cadena simple fueron amplificadas para obtener muestras patrón para la secuenciación del ADN. Estas amplificaciones fueron independientes de aquellas usadas para el análisis de SSCP. Los fragmentos de ADN amplificados fueron purificados usando el High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim). Los fragmentos de ADN purificados fueron secuenciados mediante el ABI Prism 377 ADN Sequencer (PE Applied Biosystem).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico descriptivo analizando las características clínico-patológicas de las pacientes reclutadas. Las variables categóricas fueron contrastadas con el test de la Chi-cuadrado (χ^2) con la corrección de Yates¹⁵⁹ o con los resultados exactos de Fischer cuando alguna de las frecuencias esperadas era menos de 5. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

- **Análisis univariante**

Para determinar si alguna de las variables podía predecir la recurrencia de la enfermedad de manera independiente se realizó un estudio univariante. Se analizaron todas las variables incluidas en el estudio. La relación entre la probabilidad acumulativa de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, y otros predictores analizados, fue calculada siguiendo el método de Kaplan-Meier¹⁶⁰, mientras que las diferencias significativas entre las curvas fueron evaluadas mediante el log-rank test de Mantel¹⁶¹.

- **Análisis multivariante**

Para identificar factores que podrían tener significación independiente que influyeran en la supervivencia global y en la supervivencia libre de enfermedad, se aplicó el modelo de análisis multivariante de regresión de riesgo proporcional Cox¹⁶². Este modelo incluía las variables que modificaron la estimación del ADN plasmático al diagnóstico más del 10%. Las razones de riesgo ajustadas (RR) se presentaron con sus correspondientes intervalos de confianza (CI) del 95%. Se evaluó el modelo básico de riesgos asumidos. Para cada hipótesis a contrastar, si presentaba un error tipo I (x) menos del 0.05, la hipótesis nula fue rechazada.

Para los análisis estadísticos se usó el programa del SSPS versión 11.0.

RESULTADOS

DETECCIÓN DE ADN TUMORAL PLASMÁTICO

Se estudiaron prospectivamente una serie consecutiva de 147 pacientes con cáncer de mama, reclutadas entre octubre de 1997 y julio del 2001, para determinar la presencia de ADN plasmático con características de ADN tumoral como marcador pronóstico en el momento del diagnóstico, mediante su relación con la recurrencia de la enfermedad, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global, con un seguimiento medio de 58 meses. A los tres años del inicio del estudio, con un seguimiento de 22 meses, se realizó un corte para analizar el valor predictivo del marcador en el número de recaídas y en la supervivencia libre de enfermedad. El estudio también incluyó a un grupo de 35 controles sanos.

En cinco pacientes no se detectaron niveles circulantes de ADN plasmático, siendo estos casos excluidos del análisis estadístico.

El resto de las pacientes, 142 (97%), mostraron ADN plasmático a una concentración que variaba entre 21 y 195 ng/ml (concentración media de 135 ng/ml).

En el grupo de controles, el ADN plasmático fue detectado en unas concentraciones menores que en el grupo de pacientes, con una media de 15 ng/ml y un rango de 0 a 49 ng/ml.

Tras la determinación de las mutaciones puntuales del gen TP53 y del análisis del estatus alélico de las seis regiones cromosómicas estudiadas con los marcadores usados para la caracterización del ADN plasmático como ADN tumoral, se identificaron 104 carcinomas de mama (73.2%) con al menos una alteración molecular en los marcadores estudiados. Entre estas pacientes, se identificaron 61 pacientes (42.9%) con al menos una de estas alteraciones en el ADN plasmático, sugiriendo así el origen tumoral, y fueron consideradas como positivas para ADN tumoral plasmático. De estas, 59 pacientes (41.5%) mostraron pérdida de heterocigosidad en al menos un marcador polimórfico. Mutaciones en el gen TP53 se encontraron en 10 pacientes (7%), de los cuales ocho presentaban también pérdida de heterocigosidad y 2 no mostraron

concomitancia en la pérdida de heterocigosidad en ninguno de los marcadores analizados.

En el resto de las 81 pacientes (57.1%) con un nivel detectable de ADN plasmático, no se detectaron cambios moleculares específicos del tumor, por lo que estos casos se consideraron como negativos para la presencia de ADN tumoral plasmático.

No se encontraron alteraciones con los marcadores moleculares específicos del tumor usados en el plasma de los controles sanos que mostraron cantidades detectables de ADN plasmático.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA SERIE

El total de la serie de pacientes y sus características clínico-patológicas analizadas se correlacionaron con la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico y, aparece reflejado en la Tabla 1.

La edad media de la serie fue de 55 años, con un rango entre 29 y 94 años. Las pacientes se dividieron en dos grupos de edades, mayores o menores de 55 años y, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre dichas edades y la presencia o no de ADN tumoral al diagnóstico.

La presencia de invasión vascular, uno de los factores clásicos de mal pronóstico del cáncer de mama, fue otro de los parámetros analizados y, no se vio influenciada por el ADN tumoral.

La mayoría de los tumores se encontraban en estadios iniciales intermedios (T2), y no se encontró ninguna correlación significativa entre un mayor tamaño tumoral y el ADN tumoral positivo al diagnóstico.

La afectación ganglionar axilar, el marcador pronóstico de mayor influencia en la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama, tampoco se relacionó con la presencia o no de ADN tumoral.

Cuando se analizó el grado histológico se observó una mayor tendencia a la aparición de ADN tumoral plasmático en las pacientes con tumores más agresivos, pero sin llegar a tener significación estadística.

Tanto la presencia de receptores hormonales de estrógenos como de progesterona no se vio influenciada por la del ADN tumoral, presentando el estudio de ambos receptores una incidencia muy similar.

Las pacientes, todas ellas en estadios no metastásicos, se dividieron, de acuerdo con los datos de supervivencia obtenidos tras el seguimiento medio de 58 meses, en dos

grupos de similar supervivencia: estadios I y IIA y, estadios IIB y III. La presencia de ADN tumoral al diagnóstico fue significativamente mayor en los estadios más avanzados.

El número de pacientes que recayó se relacionó positivamente con la presencia de ADN tumoral ($p<0.001$).

Las pacientes que fallecieron presentaban mayor incidencia de ADN tumoral que las que no fallecieron, con un valor significativo ($p=0.003$).

Tabla 1: Características clínico-patológicas de las 142 pacientes de la serie y su correlación con la presencia o ausencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico. El estadio tumoral se subdividió en dos grupos de supervivencia similar. El estadio, el número de recaídas y el número de fallecimientos resultaron significativos.

Variable	Categoría	ADN al diagnóstico		p
		No (81)	Si (61)	
Edad	>55	42 (58%)	30 (42%)	0.424
	<55	39 (56%)	31 (44%)	
Invasión vascular	No	62 (56%)	48 (44%)	0.373
	Si	18 (62%)	11 (38%)	
Tamaño	T1	31 (70%)	13 (30%)	0.105
	T2	39 (51%)	37 (49%)	
	T3	9 (45%)	11 (55%)	
Afectación ganglionar axilar	No	42 (62%)	26 (38%)	0.199
	Si	39 (53%)	35 (47%)	
Grado histológico	I	9 (69%)	4 (31%)	0.34
	II	36 (69%)	16 (31%)	
	III	33 (45%)	40 (55%)	
Receptores de estrógenos	No	21 (55%)	17 (45%)	0.575
	Si	58 (57%)	44 (43%)	
Receptores de progesterona	No	30 (53%)	27 (47%)	0.309
	Si	48 (59%)	34 (41%)	
Estadio	I + IIA	50 (66%)	26 (34%)	0.018
	IIB + III	31 (47%)	35 (53%)	
Recaída	No	71 (66%)	36 (34%)	<0.001
	Si	10 (29%)	25 (71%)	
Éxito	No	71 (63%)	41 (37%)	0.003
	Si	10 (33%)	20 (67%)	

SEGUIMIENTO Y RECAÍDAS A LOS 3 AÑOS

Dentro del estudio se realizó un primer corte a los 3 años del inicio, cuando el total de la serie llevaba una mediana de seguimiento de 22 meses (rango, 1-46 meses). En este periodo de tiempo se produjeron 23 recaídas (16%) de la enfermedad. Los sitios más frecuentes de recaídas fueron a nivel local y óseo, que se produjeron en 10 y 6 pacientes respectivamente. Del total de la serie, 4 pacientes murieron por progresión de la enfermedad. Dos de estas pacientes mostraban ADN tumoral plasmático y las otras dos no tenían evidencia de dicha alteración.

En base a las recaídas que se produjeron, se calculó la supervivencia libre de enfermedad, que fue de 92% en el primer año (95% CI, 87-97%), 85% para el segundo año (95% CI, 78-92%), 76% para el tercer año (95%, CI 65-87%), y 39% a los 45 meses (95%, CI 7.8-71%) (Tabla 2) (Figura 3).

De las 23 pacientes que recayeron en este periodo, en 17 (74%) se detectó ADN plasmático con características de ADN tumoral, y en 6 (26%) no se detectó. Cuando esta distribución de las pacientes con recaída fue analizada en relación con el resto de las pacientes, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.005$).

Tabla 2: En el corte a los tres años, con una media de seguimiento de la serie de 22 meses, se calculó la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a los 12, 24, 36 y 45 meses.

Tiempo (meses)	SLE	95% CI
12	92%	87 – 97
24	85%	78 – 92
36	76%	65 – 87
45	39%	7.8 - 71

Abreviaturas: SLE: Supervivencia libre de enfermedad

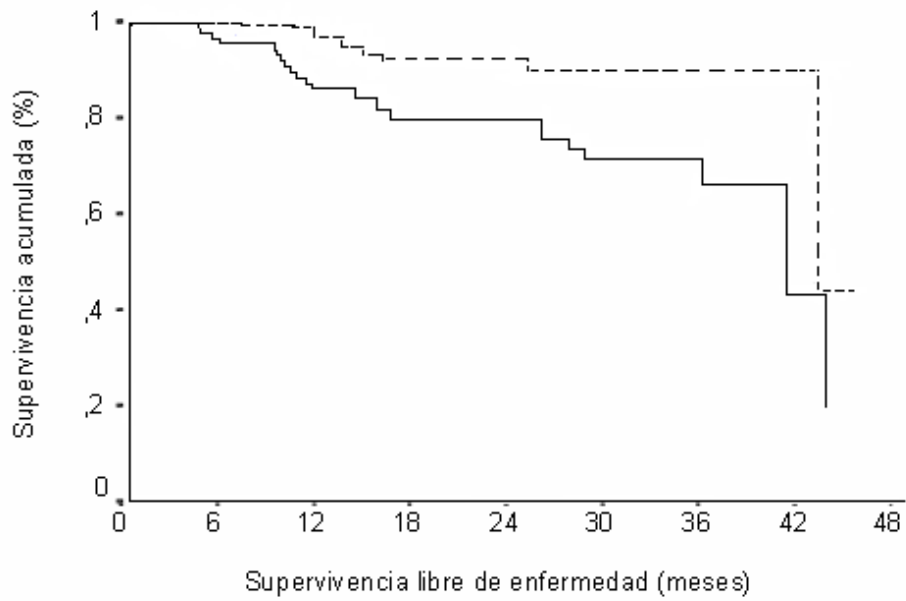


Figura 3: Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad a los 3 años de las 142 pacientes de la serie de acuerdo con la presencia o ausencia de ADN plasmático al diagnóstico ($p=0.05$). La línea continua indica ADN positivo al diagnóstico y la línea discontinua, ADN negativo al diagnóstico.

SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD A LOS 3 AÑOS

En el corte del estudio que se realizó a los tres años, se analizaron los siguientes parámetros para calcular su efecto y su posible relación con la supervivencia libre de enfermedad: expresión de c-erbB2, índice de proliferación (Ki-67), expresión de bcl-2, ADN tumoral plasmático, estadio patológico, estado menstrual, histología, afectación ganglionar axilar, tamaño tumoral, receptores de estrógenos, invasión vascular y tratamiento sistémico. Después del análisis univariante de todas las variables comentadas, sólo el tamaño tumoral, el estadio, la afectación linfática axilar y el ADN tumoral plasmático demostraron tener valor estadísticamente significativo y fueron capaces de predecir la supervivencia libre de enfermedad (Tabla 3).

Las variables que resultaron con relación significativa en el análisis univariante fueron consideradas en el modelo multivariante de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad. Las pacientes con ADN tumoral plasmático tenían un riesgo relativo en la supervivencia libre de enfermedad de 2.6 (95% CI, 0.84-8.2; $p=0.08$) cuando se compararon con el resto de pacientes sin dicha alteración molecular. Las pacientes con un tamaño tumoral mayor de 5 cm tenían un riesgo relativo en la supervivencia libre de enfermedad de 3.0 (95% CI, 1.1-8.2; $p=0.03$) en comparación con las pacientes con tumores de menor tamaño. La presencia de afectación ganglionar axilar tenía un riesgo relativo en supervivencia libre de enfermedad de 2.6 (95% CI, 0.85-8.3; $p=0.09$) en comparación con las pacientes sin afectación axilar. Las pacientes con estadios tumorales más avanzados presentaban un riesgo de 1.9 (95% CI, 0.4-8.9; $p=0.4$) comparadas con aquellas con estadios más precoces (Tabla 4).

Tabla 3: Análisis de las variables que alcanzaron valor estadísticamente significativo tras el análisis univariante en relación con la supervivencia libre de enfermedad a los 3 años. No se reflejan el resto de variables analizadas ya que al no presentar valor estadísticamente significativo no influyen en la supervivencia libre de enfermedad.

Variable	Nº	SLE (45 meses)	p (log-rank)
Estadio			
I	29	90 %	0.0001
II	88	60 %	
IIIA	21	57 %	
IIIB	4	0 %	
Nº ganglios axilares afectados			
0	68	91 %	0.05
1-3	41	32 %	
>3	33	35 %	
Tamaño tumoral (mm)			
0-20	44	89 %	0.03
21-50	78	32 %	
>50	20	61 %	
ADN tumoral plasmático			
No detectado	81	44 %	0.05
Detectado	61	34 %	

Abreviaturas: Nº: número de pacientes; SLE: Supervivencia libre de enfermedad.

Tabla 4: Modelo de riesgo proporcional para la supervivencia libre de enfermedad a los tres años (análisis multivariante). El valor RR representa el riesgo relativo de recaída de la enfermedad a los tres años cuando la variable analizada estaba presente, así el ADN positivo al diagnóstico confiere un riesgo relativo de recaída de 2.6.

Variable	Categoría	<i>p</i>	RR	95% CI
ADN al diagnóstico	Si vs No	0.08	2.6	0.84 - 8.2
Tamaño tumoral	> 5 cm vs < 5 cm	0.03	3.0	1.1 - 8.2
Afectación ganglionar axilar	Si vs No	0.09	2.6	0.85 - 8.3
Estadio	IIIA + IIIB vs I + II	0.4	1.9	0.4 - 8.9

Abreviaturas: RR: Riego relativo.

SEGUIMIENTO Y RECAÍDAS A LOS 5 AÑOS

Este periodo de seguimiento, que incluye 5 años y tras el cual finaliza el estudio, comprende el intervalo de tiempo desde la cirugía y la última visita o la muerte de la paciente. Hasta agosto de 2004, las pacientes habían sido seguidas una media de 58 meses, con un rango entre 37 y 82 meses.

Durante este periodo se produjeron 35 recaídas (24.6%) de la enfermedad. Del total de las recaídas, 15 (42.8%) fueron locales, 10 (28.6%) fueron metástasis óseas y 10 (28.6%) recaídas de la enfermedad a otros niveles.

La edad media de las pacientes que recayeron durante el seguimiento fue de 61 años, con un rango entre 35 y 89 años.

ADN tumoral plasmático fue detectado en 25 de las 35 pacientes que recayeron (71.4%), en contraste con su detección en 36 de las 107 pacientes sin enfermedad metastásica (33.6%); ($p < 0.001$). Las cifras de recaídas de las pacientes alcanzan significación estadística cuando se relacionan con la presencia de ADN tumoral plasmático.

SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD A LOS 5 AÑOS

Durante el seguimiento, se observaron 35 recaídas. En base a este número, y con el seguimiento de 5 años, la supervivencia libre de enfermedad de la serie a los 1, 2, 3, 4 y 5 años viene reflejada en la Tabla 5.

La supervivencia libre de enfermedad entre las pacientes con ADN tumoral plasmático al diagnóstico fue de 54% (95% CI, 41% - 67%) mientras que en pacientes en las que no se detectó ADN tumoral plasmático fue de 86% (95% CI, 78% - 93%); ($p=0.0003$) (Figura 4A).

El análisis univariante de las características clínicas y patológicas demostró que cuatro de esos parámetros eran predictores significativos de la supervivencia libre de enfermedad: tamaño tumoral, afectación axilar ganglionar, estadio y ADN tumoral plasmático.

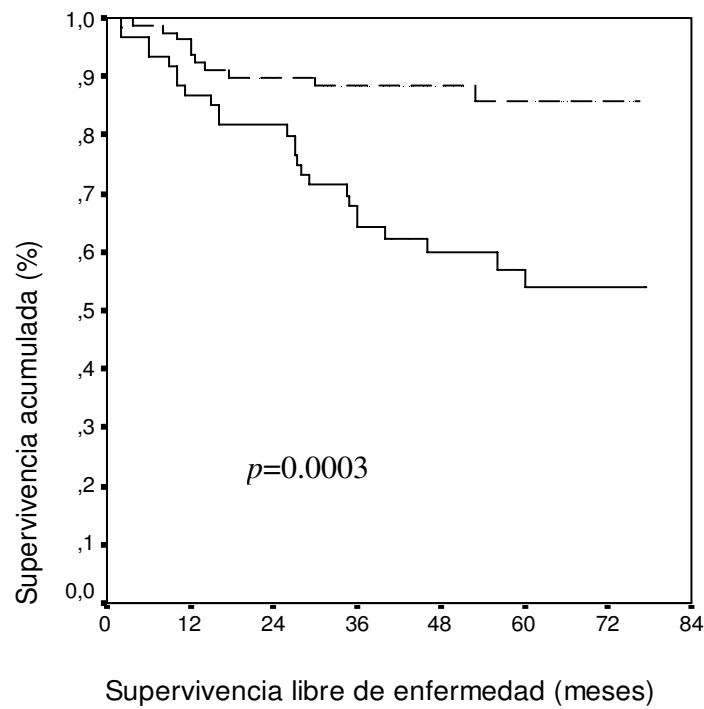
El análisis multivariante identificó sólo al ADN tumoral plasmático al diagnóstico con valor predictivo para la supervivencia libre de enfermedad (Tabla xx6).

Tabla 5: Supervivencia libre de enfermedad de la serie, con una media de seguimiento de 58 meses, a los 1, 2, 3, 4, y 5 años.

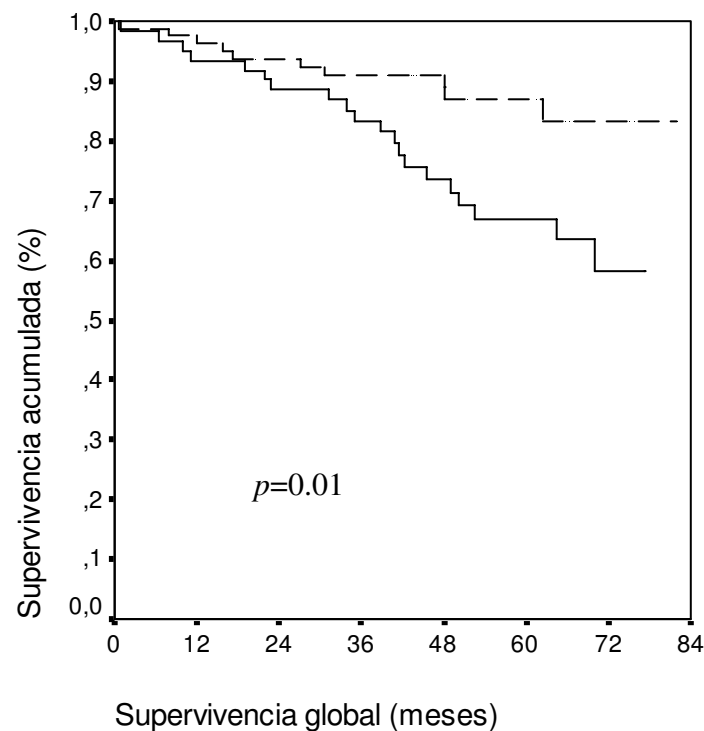
Tiempo (meses)	SLE	95% CI
12	91%	87 – 95
24	86%	80 – 92
36	78%	70 – 86
48	76%	68 – 84
60	71%	63 – 79

Abreviaturas: SLE: Supervivencia libre de enfermedad

4A



4B



Figuras 4A y 4B: Curvas de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años (A) y de supervivencia global (B) de Kaplan-Meier en relación a la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico. La línea continua indica ADN positivo al diagnóstico y la línea discontinua, ADN negativo al diagnóstico.

Tabla 6: Análisis de la asociación entre la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico y la supervivencia libre de enfermedad con una media de seguimiento de 58 meses. Las celdas en blanco son las variables que no modifican a la variable ADN al diagnóstico en más del 10% de su valor, no consideradas para el análisis multivariante.

Variable	Categoría	Análisis Univariante			Análisis Multivariante		
		HR	(95% CI)	p	HR	(95% CI)	p
ADN al diagnóstico	Si vs No	2.7	1.3 - 5.7	0.007	2.7	1 - 6.9	0.038
Edad al diagnóstico	<55 vs >55	1.8	0.9 - 3.6	0.091	2.1	0.9 - 4.9	0.084
Invasión vascular	Sí vs No	1.8	0.8 - 3.8	0.157	1.4	0.5 - 3.6	0.52
Tamaño tumoral	T2 vs T1	2.4	1.0 - 6.1	0.010			
	T3 vs T1	4.8	1.6 - 14.1	0.004			
Afectación ganglionar axilar	Si vs No	3.6	1.7 - 7.9	0.001	2.6	0.5 - 12.7	0.23
Grado histológico	2 vs 1	0.9	0.3 - 3.5	0.921			
	3 vs 1	1.3	0.4 - 4.5	0.638			
Receptores de estrógenos	- vs +	1.4	0.6 - 2.9	0.415	2	0.9 - 4.7	0.19
Receptores de progesterona	- vs +	1.44	0.68 - 3.01	1.44			
Estadio	IIA vs I	0.8	0.2 - 2.7	0.718	0.4	0.1 - 1.8	0.22
	IIB vs I	2.3	0.9 - 6.1	0.087	0.7	0.1 - 4.8	0.74
	III vs I	4.5	1.6 - 12.9	0.005	1.5	0.2 - 10.6	0.69
Tratamiento	2 vs 1	1.8	0.9 - 3.7	0.095			
Estado menstrual	Pre vs post	1.24	0.61 - 2.55	0.55			
Tipo histológico	DI vs Lob	0.47	0.11 - 1.96	0.3			
	Otros	1.02	0.39 - 2.67	0.97			
c-erbB2	Si vs No	1.28	0.38 - 4.32	0.69			
Ki-67	Si vs No	1.66	0.47 - 5.92	0.43			
bcl-2	Si vs No	0.49	0.16 - 1.47	0.2			

Abreviaturas: HR: hazard ratio; CI: intervalo de confianza; Tratamiento 1: cirugía, cirugía más radioterapia, cirugía más quimioterapia, cirugía más radioterapia más quimioterapia y, cirugía más radioterapia más quimioterapia más hormonoterapia.

Tratamiento 2: cirugía más hormonoterapia, cirugía más quimioterapia y radioterapia y, cirugía más radioterapia y hormonoterapia. DI: carcinoma ductal infiltrante; Lob: carcinoma lobulillar infiltrante.

SUPERVIVENCIA GLOBAL A LOS 5 AÑOS

Durante el periodo de seguimiento se produjeron 30 muertes, de las que 20 (66.7%) fueron de pacientes con ADN tumoral positivo y 10 (33.3%) con ADN tumoral negativo en el momento del diagnóstico. Por el contrario, de las 112 pacientes que no fallecieron, 71 (63.4%) no tenían ADN tumoral al diagnóstico frente a 41 (36.6%) en las que este era positivo. Analizando el número de éxitos de la serie, observamos que fallece el 32.7% de las pacientes que tenían ADN tumoral positivo al diagnóstico y, el 12.3% de las que tenían el ADN tumoral negativo al diagnóstico ($p=0.003$).

En el análisis final, la supervivencia global de la serie tras los cinco años de seguimiento fue del 71% (95% CI, 61% - 81%). Cuando se analizó la supervivencia global en relación a la presencia o ausencia de ADN tumoral en plasma en el momento del diagnóstico, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los casos positivos, los cuales mostraban una supervivencia global a los cinco años del 59% (95% CI, 45% - 73%), y los casos negativos que mostraban una supervivencia global a los cinco años del 83% (95% CI, 73% - 93%); ($p=0.01$). (Figura 4B)

Se realizó un análisis univariante para determinar la influencia del ADN plasmático tumoral y de las características clínicas y patológicas de las pacientes en la supervivencia global. Aquellas variables que pueden ser consideradas como factores estadísticamente significativos en la predicción de la supervivencia global fueron: edad al diagnóstico, tamaño tumoral, afectación ganglionar axilar, receptores de estrógenos, estadio, tipo de tratamiento y la presencia de ADN tumoral plasmático (Tabla 7).

El análisis reveló similitudes en relación con la supervivencia global entre los estadios I y IIA, y diferencias entre los estadios I y IIB y entre los estadios I y III (Figura 5). Consecuentemente, para realizar el análisis multivariante mediante el modelo de regresión de Cox, se procedió a un agrupamiento de los estadios y así, los estadios I y IIA fueron considerados como estadios iniciales y los estadios IIB y III fueron considerados como estadios más avanzados.

Usando las variables generadas por el análisis univariante, se estableció un modelo de regresión de Cox multivariante para la supervivencia global. Entre aquellas variables, la edad al diagnóstico, los receptores de estrógenos, tamaño tumoral y afectación ganglionar axilar demostraron una relación de independencia sobre la supervivencia global (Tabla 7).

Aunque la positividad del ADN tumoral plasmático no mostró un valor de p estadísticamente significativo, sí que mostró un riesgo relativo de 1.6 con respecto de las pacientes que tenían ADN plasmático negativo. El valor de la p en nuestro estudio, aunque no alcanza un valor estadísticamente significativo, sí que muestra una tendencia hacia la significación, que probablemente se hubiera alcanzado con una serie mayor o con un periodo de seguimiento más prolongado.

Tabla 7: Análisis de la asociación entre la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico y la supervivencia global de las pacientes con una media de seguimiento de 58 meses. Las celdas en blanco corresponden a las variables que no modifican a la variable ADN al diagnóstico en más del 10% de su valor y no se han considerado para el análisis multivariante.

Variable	Categoría	Análisis Univariante			Análisis Multivariante		
		HR	(95% CI)	p	HR	(95% CI)	p
ADN al diagnóstico	Si vs No	2.5	1.2 - 5.3	0.018	1.6	0.6 - 4.4	0.3
Edad al diagnóstico	<55 vs >55	3.2	1.4 - 7.2	0.005	2.5	0.9 - 6.4	0.06
Invasión vascular	Si vs No	1.2	0.5 - 2.7	0.716	0.9	0.3 - 2.5	0.8
Tamaño tumoral	T2 vs T1	6.7	1.6 - 28.7	0.010	4.1	0.8 - 19.8	0.07
	T3 vs T1	8.9	1.9 - 43.0	0.006	6.1	1.1 - 34.1	0.03
Afectación ganglionar axilar	Si vs No	3.9	1.6 - 9.6	0.003	2.5	0.9 - 6.9	0.07
Grado histológico	2 vs 1	0.38	0.1 - 1.7	0.210			
	3 vs 1	1.5	0.4 - 4.9	0.527			
Receptores de estrógenos	- vs +	2.4	1.1 - 5.1	0.022	4.5	1.9 - 10.4	<0.001
Receptores de progesterona	- vs +	0.93	0.45 - 1.92	0.83			
Estadio	IIB+III vs I+II	5.1	2.1 - 12.5	<0.001			
Tratamiento	2 vs 1	3.2	1.3 - 7.9	0.011	1.5	0.5 - 3.9	0.4
Estado menstrual	Pre vs post	2	0.86 - 4.66	0.19			
Tipo histológico	DI vs Lob	0.26	0.04 - 1.94	0.19			
	DI vs Otros	0.95	0.36 - 2.5	0.92			
c-erbB2	Si vs No	2.7	0.68 - 11.32	0.15			
Ki-67	Si vs No	5.1	0.64 - 39.58	0.12			
bcl-2	Si vs No	0.1	0.1 - 3.23	0.15			

Abreviaturas: HR: hazard ratio; CI: intervalo de confianza; Tratamiento 1: cirugía, cirugía más radioterapia, cirugía más quimioterapia, cirugía más radioterapia más quimioterapia y, cirugía más radioterapia más quimioterapia más hormonoterapia. Tratamiento 2: cirugía más hormonoterapia, cirugía más quimioterapia y radioterapia y, cirugía más radioterapia y hormonoterapia. DI: carcinoma ductal infiltrante; Lob: carcinoma lobulillar infiltrante.

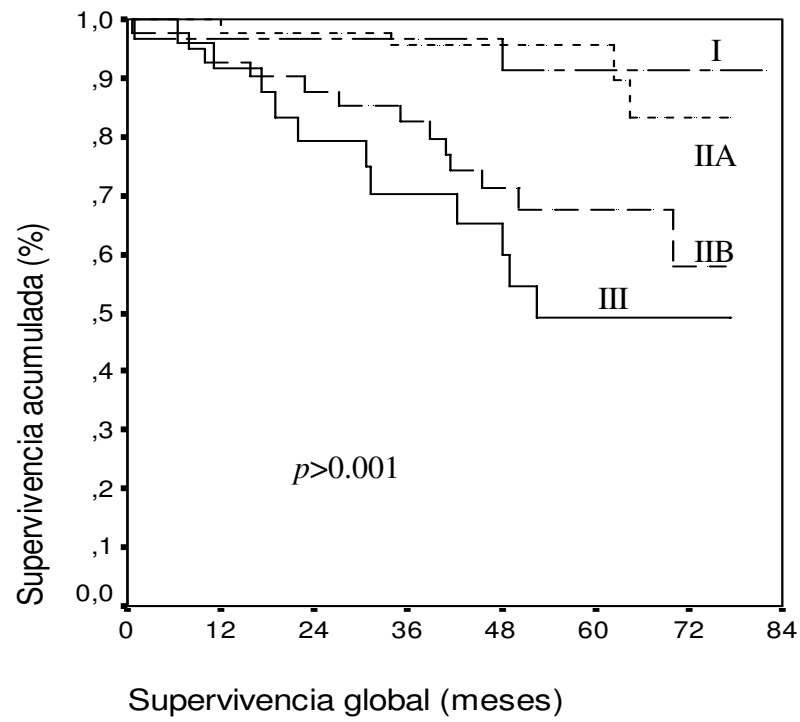


Figura 5: Curvas de supervivencia libre de enfermedad de Kaplan-Meier en relación con el estadio tumoral.

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE ADN TUMORAL PLASMÁTICO CON CARGA TUMORAL Y GRADO HISTOLÓGICO

- **Relación del ADN tumoral plasmático con la afectación axilar**

Se estableció una comparación directa entre el factor pronóstico más importante en el cáncer de mama, la afectación ganglionar axilar y, la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico, en relación con la supervivencia.

Entre las 68 pacientes sin afectación ganglionar axilar, fallecieron 6; 3 pacientes presentaban ADN tumoral plasmático y las otras 3 no ($p=0.7$). Figura 6A.

En cambio, de las 74 pacientes con afectación ganglionar axilar, el número de fallecimientos fue de 24; de éstas, 16 presentaban ADN tumoral plasmático y 8 no ($p=0.08$). Figura 6B.

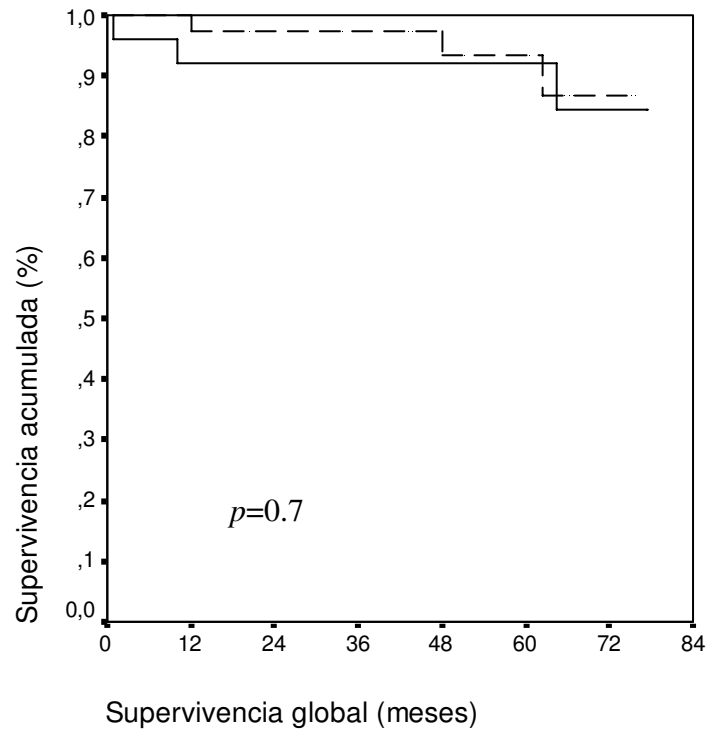
- **Relación del ADN tumoral plasmático y del grado histológico con la carga tumoral**

Se comparó el papel del factor pronóstico grado histológico con el del ADN tumoral al diagnóstico estudiando su influencia en la supervivencia de forma separada, en pacientes con poca carga tumoral (sin afectación axilar y con tamaño tumoral T1-T2) y, por otro lado en las pacientes con elevada carga tumoral (afectación axilar y mayor tamaño tumoral (T3), para poder valorar si alguno de ellos era capaz de discriminar grupos de evolución diferente.

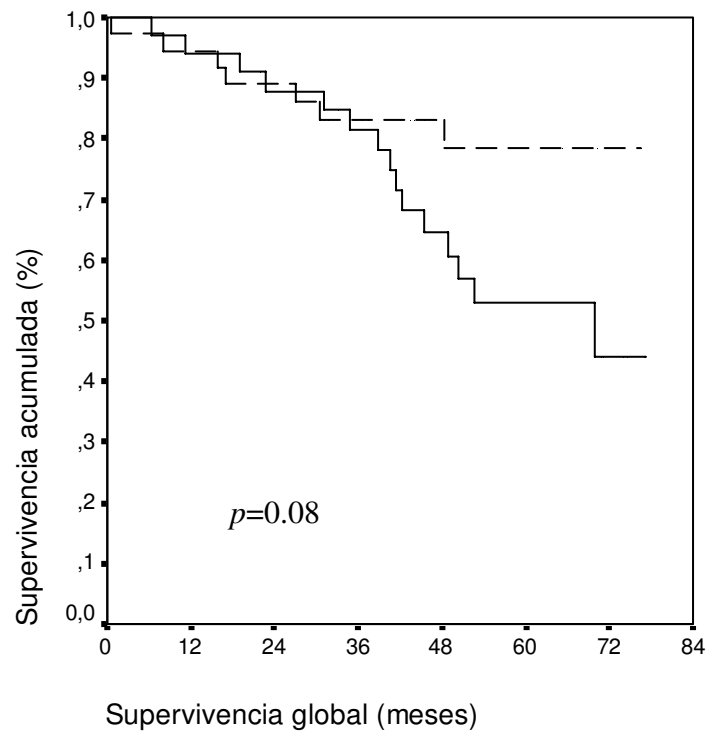
En el grupo de pacientes con baja carga tumoral se produjeron 6 muertes. De estas, 2 presentaban grado histológico 1 y 2 y, 4 presentaban grado histológico 3. A su vez 3 tenían ADN tumoral positivo y 3 tenían ADN tumoral negativo. Estos valores no resultan significativos estadísticamente (Figura 7A y 8A).

En el grupo de pacientes con elevada carga tumoral fallecieron 24 pacientes y, tanto al analizar la presencia entre ellos del ADN tumoral plasmático y del grado histológico 3, ambos parámetros tienen significación en cuanto a la supervivencia global, discriminando grupos de pacientes de peor evolución (Figura 7B y 8B).

6A

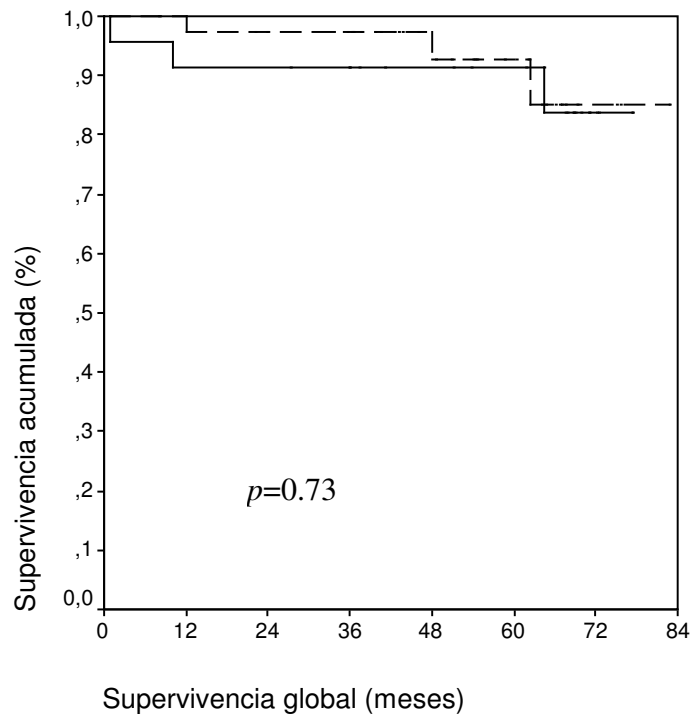


6B

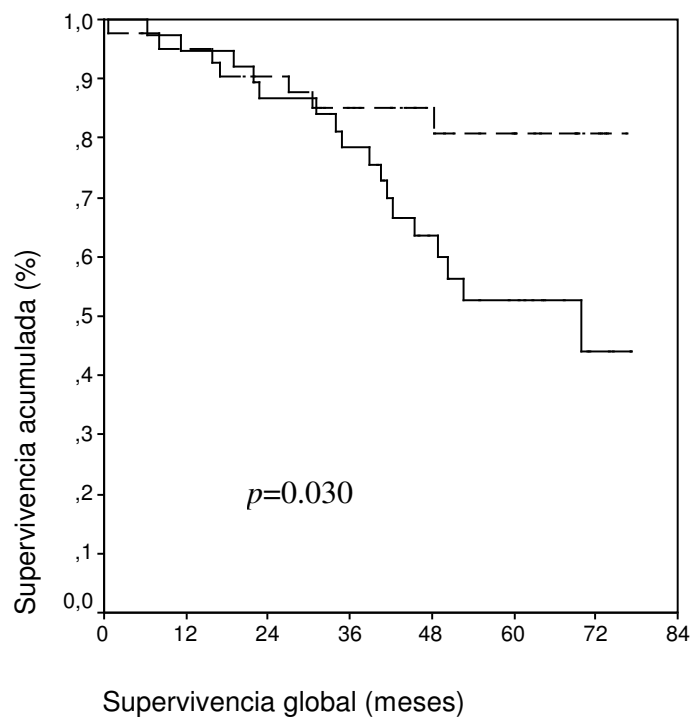


Figuras 6A y 6B: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación a la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico en el grupo de pacientes sin afectación ganglionar axilar (6A) y con afectación axilar (6B). La línea continua indica ADN positivo al diagnóstico y la línea discontinua, ADN negativo al diagnóstico.

7A

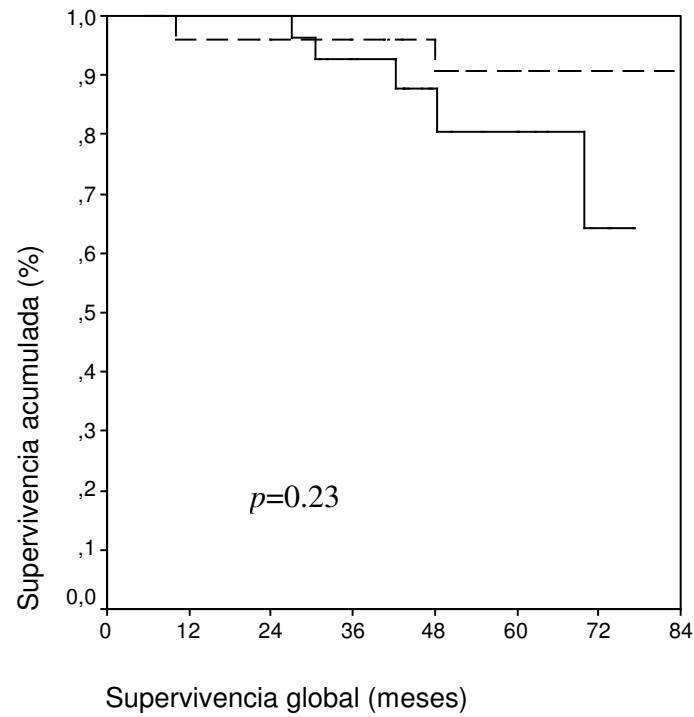


7B

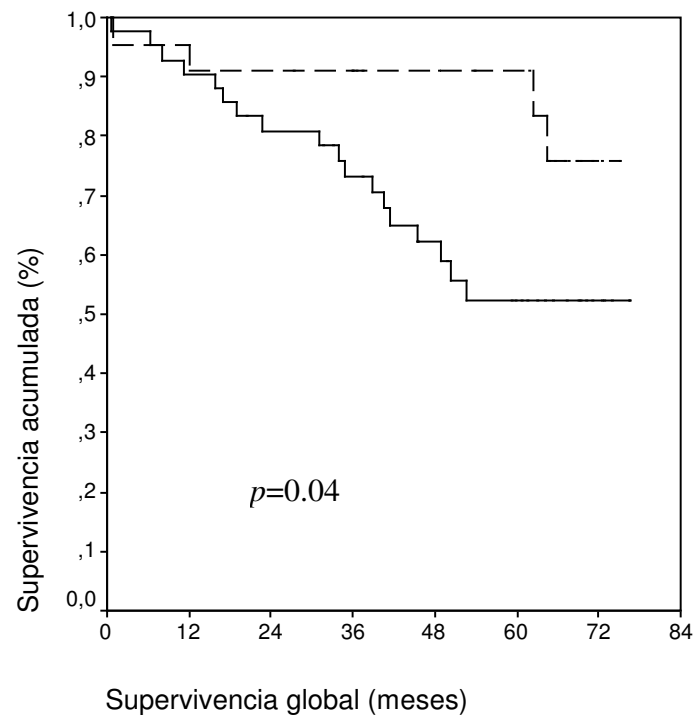


Figuras 7A y 7B: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación a la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico en el grupo de pacientes con baja carga tumoral (7A) y con elevada carga tumoral (7B). La línea continua indica ADN positivo al diagnóstico y la línea discontinua, ADN negativo al diagnóstico.

8A



8B



Figuras 8A y 8B: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación al grado histológico en el grupo de pacientes con baja carga tumoral (8A) y con elevada carga tumoral (8B). La línea continua indica grado histológico 3 y la línea discontinua, grados histológicos 1 y 2.

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO Y ADN TUMORAL PLASMÁTICO

Toda la cohorte de pacientes del estudio se dividió en diferentes subgrupos de acuerdo con el tratamiento realizado y posteriormente se analizó la relación de dichos subgrupos con la supervivencia.

De los ocho grupos de pacientes con los distintos tratamientos administrados, que se comentan en el apartado Material y Métodos, en sólo cuatro de ellos se pudo analizar la supervivencia. En los otros cuatro grupos no se pudo alcanzar poder estadístico suficiente al tener un número escaso de pacientes. Los grupos analizados fueron los siguientes: A) cirugía y hormonoterapia (n: 37); B) cirugía más quimioterapia adyuvante y radioterapia local complementaria (n: 24); C) cirugía más radioterapia local complementaria y hormonoterapia (n: 21); y D) cirugía seguida de quimioterapia adyuvante, radioterapia local complementaria y hormonoterapia (n: 13). La presencia de ADN plasmático al diagnóstico permitió identificar un comportamiento diferente en términos de supervivencia global en los grupos (B) y (C) ($p=0.03$ y $p=0.004$, respectivamente). En la Figura 9, se observa cómo en los grupos de tratamiento (B) y (C), la presencia de ADN implica peor supervivencia de las pacientes.

Se analizaron los grupos de pacientes que se trataron sólo con quimioterapia y sólo con hormonoterapia y se representan en la Figura 10. En el grupo de pacientes que recibieron tratamiento con quimioterapia, sin ADN tumoral plasmático al diagnóstico, la supervivencia global fue de 88% (95% CI, 73% - 100%) y, con ADN tumoral plasmático positivo fue de 54% (95% CI, 51% - 97%); $p=0.08$. En el grupo de pacientes tratado con hormonoterapia y sin ADN positivo al diagnóstico, la supervivencia global fue de 84% (95% CI, 73% - 95%) y la de los pacientes con ADN positivo fue de 61% (95% CI, 40% - 82%); $p=0.16$.

Una vez obtenidos los resultados definitivos del seguimiento a los 58 meses y, dadas las diferencias halladas en la supervivencia de las pacientes, éstas las pudimos agrupar en dos grupos bien diferenciados: el primer grupo, formado por 82 pacientes, estaba compuesto por tres subgrupos de pacientes tratadas con cirugía más hormonoterapia, cirugía más quimioterapia y radioterapia y, cirugía más radioterapia y

hormonoterapia. La supervivencia acumulada a los cinco años de estas pacientes era menor del 76%, y consideramos este grupo como de peor pronóstico. El segundo grupo, formado por 60 pacientes presentó una supervivencia global más alta que la del primer grupo. El ADN tumoral plasmático positivo al diagnóstico identificó una diferencia en el patrón de supervivencia en el primer grupo, el de peor supervivencia (Figura 11A). En este grupo, la supervivencia global a los cinco años en pacientes con ADN plasmático positivo al diagnóstico fue 42% (95% CI, 22% - 62%) y en las pacientes con ADN plasmático negativo al diagnóstico fue 78% (95% CI, 62% - 94%). Esta diferencia no se halló en el segundo subgrupo, de mejor supervivencia (Figura 11B).

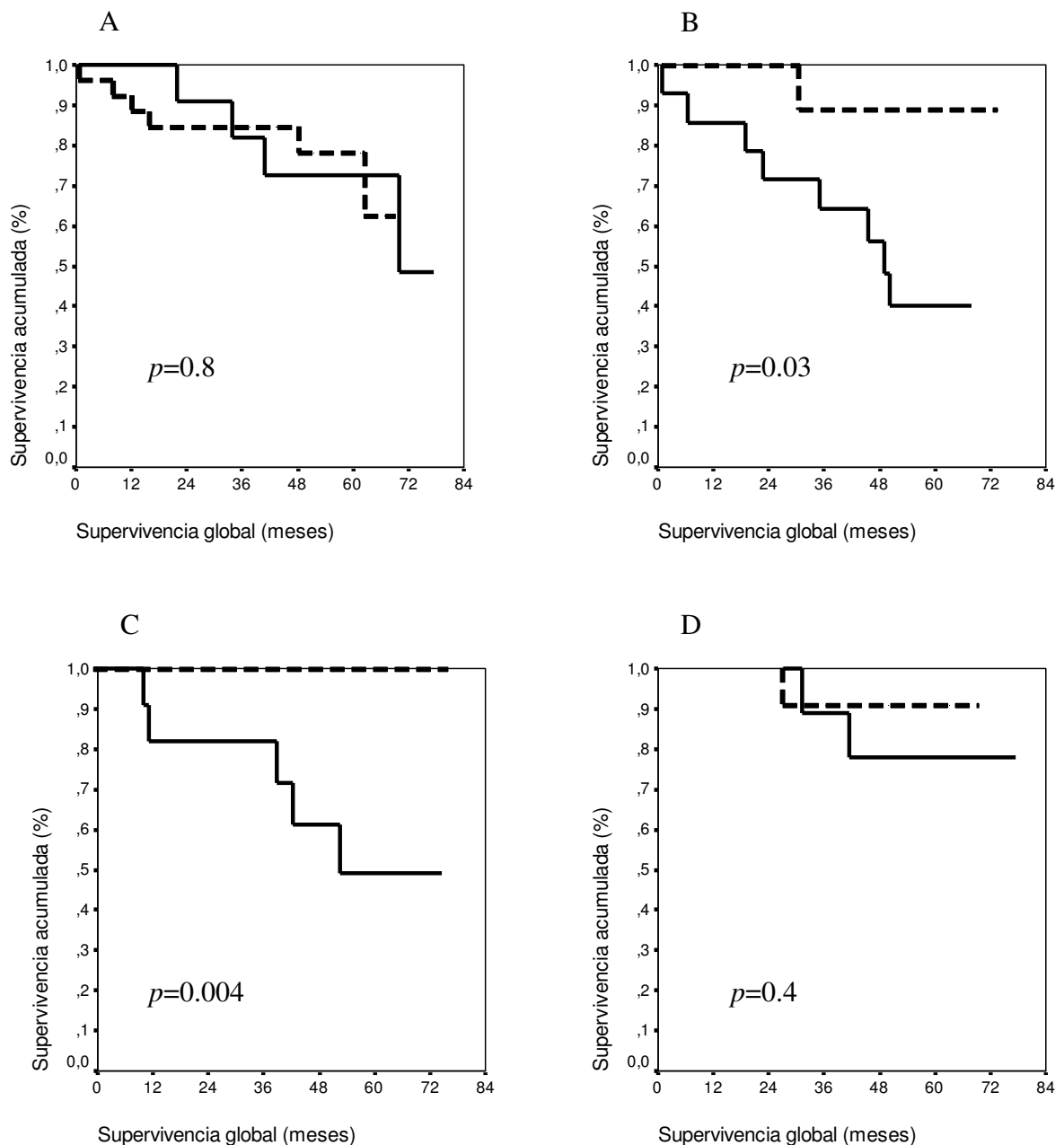
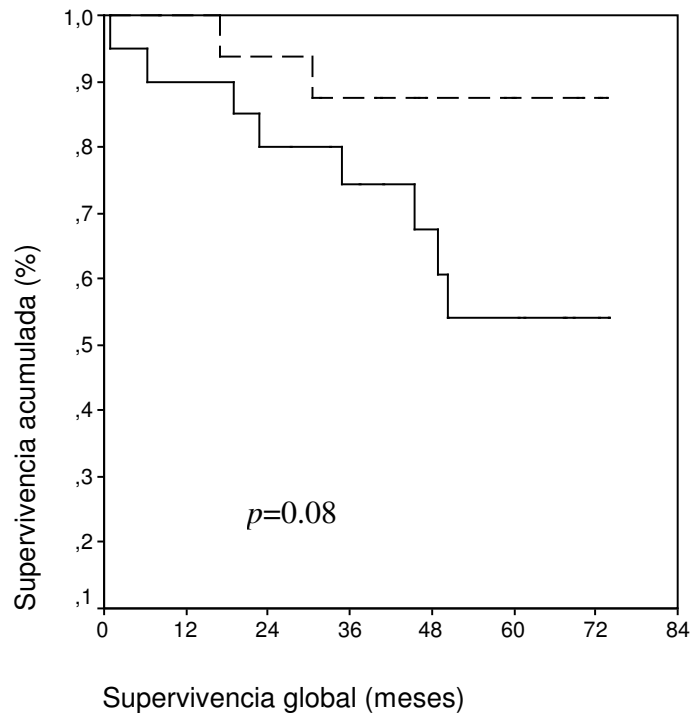
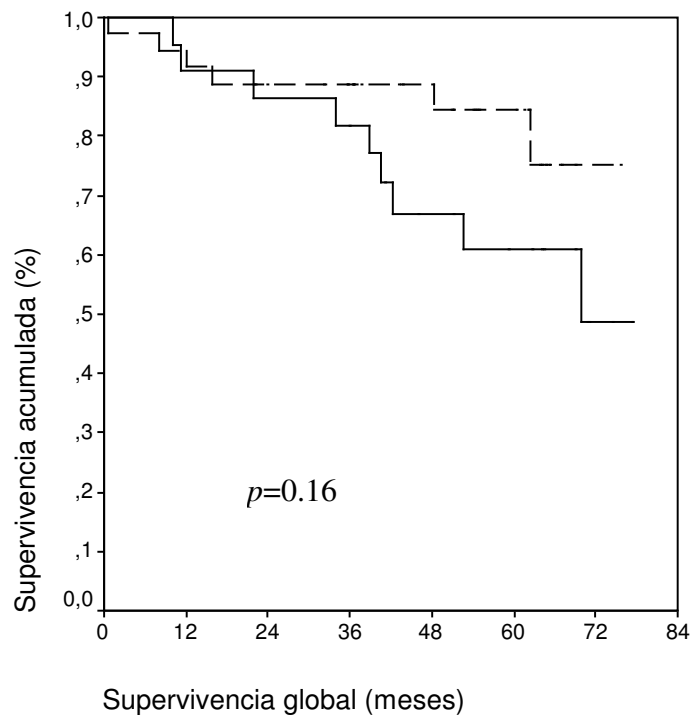


Figura 9: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación con la presencia de ADN tumoral plasmático en los cuatro grupos establecidos en base al tipo de tratamiento: A, cirugía y hormonoterapia; B, cirugía más quimioterapia adyuvante y radioterapia local complementaria; C, cirugía más radioterapia local complementaria y hormonoterapia; y D, cirugía seguida de quimioterapia adyuvante, radioterapia local complementaria y hormonoterapia. La línea continua indica ADN positivo al diagnóstico y la línea discontinua, ADN negativo al diagnóstico.

10A

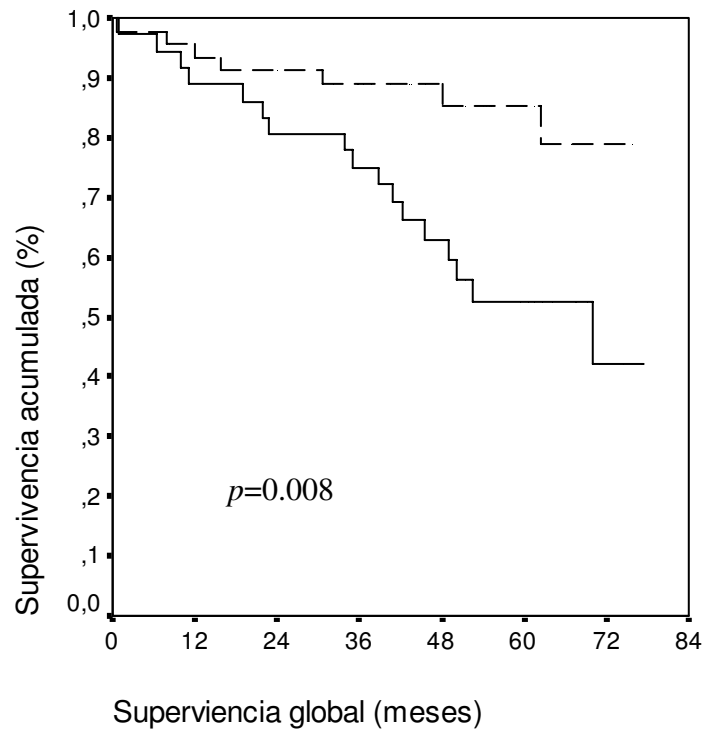


10B



Figuras 10A y 10B: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación al ADN tumoral al diagnóstico en pacientes tratados con quimioterapia (10A) y en los tratados con hormonoterapia (10B). La línea continua indica ADN positivo al diagnóstico y la línea discontinua, ADN negativo al diagnóstico.

11A



11B

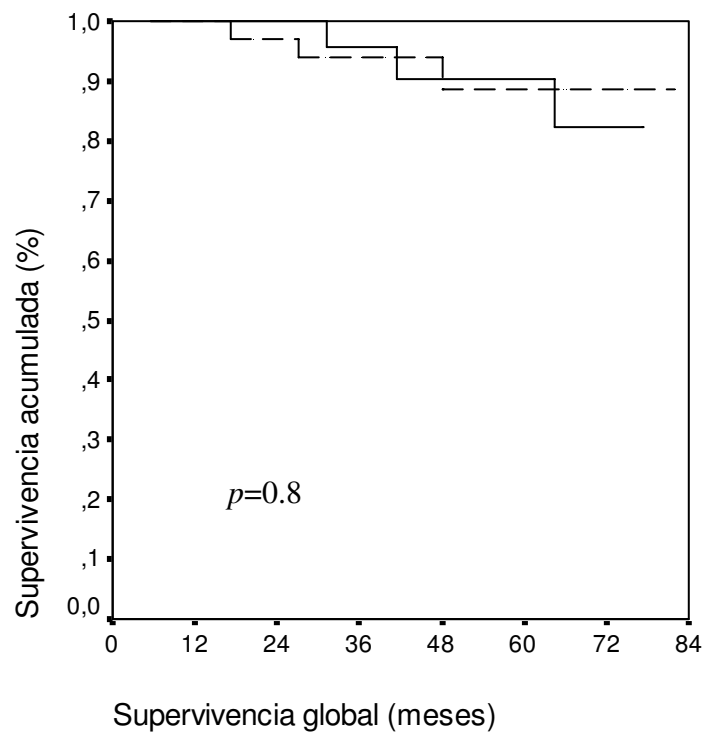


Figura 11A y 11B: Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier en relación con la presencia de ADN tumoral plasmático en los grupos establecidos en base a la evolución. 11A: mal pronóstico, n=82; 11B: buen pronóstico, n= 60. La línea continua indica ADN positivo al diagnóstico y la línea discontinua, ADN negativo al diagnóstico.

ANÁLISIS INDEPENDIENTE DE MARCADORES DE MICROSATÉLITE Y TP53

No se observaron correlaciones individuales entre los diferentes marcadores usados en la supervivencia libre de enfermedad ni en la supervivencia global.

Los análisis de regresión de Cox en relación a la supervivencia libre de enfermedad y a la supervivencia global para cada uno de los marcadores figuran en la Tabla 8.

La supervivencia global los 5 años fue del 59% (95% CI, 43% - 75%) para los 59 pacientes con pérdida de heterocigosidad en al menos uno de los marcadores tipo microsatélite, y 82% (95% CI, 72% - 92%) para los 83 pacientes sin pérdida de heterocigosidad en ninguno de los marcadores tipo microsatélite analizados; ($p=0.028$).

La supervivencia global a los cinco años en los 10 pacientes con mutaciones en TP53 fue del 89% (95% CI, 69% - 100%) y para los 132 pacientes sin mutaciones en TP53 fue de 72% (95% CI, 64% - 80%); ($p=0.35$).

Tabla 8: Frecuencia de la pérdida de heterocigosidad para cada marcador de microsatélite y de las mutaciones del gen TP53 en el tejido tumoral y en las muestras de plasma y análisis univariante de acuerdo con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad para cada una.

Marcador	IFN	LOH	Supervivencia libre de enfermedad			Supervivencia global			
			HR	(95% CI)	<i>p</i>	HR	(95% CI)	<i>p</i>	
TH2	71 (50%)	T	14 (20%)	0.69	0.2 – 2.4	0.57	0.69	0.15 – 3.2	0.63
		P	12 (17%)	0.51	0.12 – 2.24	0.38	0.88	0.19 – 4.05	0.87
D10S197	60 (42%)	T	14 (23%)	1.92	0.66 – 5.63	0.23	1.17	0.22 – 6.4	0.85
		P	13 (22%)	2.19	0.75 – 6.43	0.15	1.4	0.26 – 7.7	0.69
D16S421	54 (38%)	T	24 (44%)	1.49	0.54 – 4.11	0.44	1.7	0.59 – 4.9	0.32
		P	20 (37%)	1.12	0.4 – 3.16	0.82	0.92	0.3 – 2.73	0.87
D17S855	74 (52%)	T	26 (35%)	1.85	0.79 – 4.37	0.16	1.3	0.54 – 3.3	0.5
		P	21 (28%)	1.71	0.72 – 4.06	0.22	0.9	0.34 – 2.38	0.83
D17S654	81 (57%)	T	36 (44%)	1.84	0.74 – 4.59	0.19	2.26	0.82 – 6.22	0.11
		P	28 (35%)	2.19	0.89 – 5.39	0.09	1.54	0.57 – 4.15	0.39
D9S161	77 (54%)	T	20 (26%)	2.1	0.75 – 5.9	0.16	1.48	0.48 – 4.58	0.40
		P	18 (23%)	2.5	0.89 – 7.06	0.082	1.7	0.55 – 5.27	0.39
TP53				1.85	0.65 – 5.24	0.25	0.4	0.05 – 2.94	0.37

Abreviaturas: IFN: número y porcentaje de casos informativos; T: muestra tumoral; P: muestra plasmática; HR: hazard ratio; CI: intervalo de confianza; Lob: carcinoma lobulillar infiltrante; DI: carcinoma ductal infiltrante.

DISCUSIÓN

PRESENCIA DE ADN TUMORAL EN PLASMA

- **Detección, cuantificación y caracterización del ADN plasmático**

La presencia de concentraciones detectables de ADN libre en el plasma de controles sanos y, en concentraciones anormalmente altas, en el de pacientes con diversas patologías, es un hecho demostrado desde los estudios de Mandel y Métais¹¹¹, como se ha comentado previamente. En nuestra serie estudiamos muestras de ADN de controles sanos y de pacientes, extraídas de tejido tumoral y de tejido normal, de linfocitos y de plasma y, encontramos la presencia de ADN en el 97% de las pacientes con cáncer de mama, y en el 76% de controles sanos, con unas concentraciones claramente diferentes.

La transformación maligna de las células se asocia a numerosos cambios genéticos, que pueden ser marcadores de desdiferenciación celular y de progresión. Independientemente de si estas alteraciones juegan un papel en la transformación maligna, o bien si son expresión secundaria de ésta, su determinación en plasma y su correlación pronóstica pueden proporcionarnos datos útiles tanto en estudios de investigación básica y clínica como en procedimientos de rutina asistencial. El estudio realizado demuestra que es posible la detección de ADN con las alteraciones genéticas encontradas en el tumor, en el plasma de las pacientes y que su presencia puede tener relación con el pronóstico. Algunos estudios pioneros pusieron las primeras bases de esta línea de investigación y de sus potenciales aplicaciones.

En 1977, Leon¹¹³ describió, en una serie de 173 pacientes con varios tipos de cánceres, una concentración media de ADN en suero, determinada por radioinmunoensayo, de 180 ng/ml. La distribución de esta cifra media, dependiendo de la extensión de la enfermedad, reveló una cantidad de 209 ng/ml en pacientes con enfermedad metastásica comparada con 100 ng/ml en pacientes con enfermedad no diseminada. En 55 controles sanos, la concentración de ADN sérico observada fue de 13 ng/ml de media (de 0 a 100 ng/ml). En este estudio los autores trataron de encontrar alguna correlación entre estas altas concentraciones de ADN sérico y algunas

características del tumor, observando como único dato significativo la disminución del mismo en más de un 90% después del tratamiento con radioterapia, especialmente en linfomas, tumores de cabeza y cuello y en adenocarcinomas de pulmón, ovario y endometrio, manteniéndose persistentemente altas las cifras iniciales en aquellos pacientes sin respuesta al tratamiento. Esta última observación fue un dato significativo a favor del origen tumoral de estas altas concentraciones de ADN plasmático.

Sin embargo, estas observaciones eran de carácter cuantitativo y en este análisis no se caracterizaba el ADN encontrado en el suero como ADN tumoral. El aislamiento y la cuantificación del ADN plasmático total en pacientes con cáncer se demostró que era rutinariamente factible. Sin embargo la identificación de la correspondiente cantidad de ADN tumoral plasmático requiere de métodos más específicos.

A finales de los años 80, se demostró que el ADN circulante tenía características físico-químicas similares al ADN del tumor primario¹¹⁴.

Posteriormente varios autores^{163, 124, 164} analizaron el ADN presente en el plasma de forma cualitativa, observando que las alteraciones moleculares encontradas en el ADN plasmático eran similares a las detectadas en el ADN tumoral, proporcionando así suficiente evidencia sobre el origen tumoral del ADN extracelular detectado en sangre periférica.

Muchos tipos de tumores, incluidos los más frecuentes, se asocian con la presencia de ADN tumoral plasmático positivo y numerosas estrategias moleculares y distintos marcadores génicos se han usado con éxito para caracterizar este ADN. Adicionalmente, altas concentraciones de ADN plasmático en pacientes con cáncer se han asociado con ciertas características de la enfermedad y con el pronóstico de los pacientes. Incluso ADN procedente de virus, como es el caso del ADN del virus Epstein-Barr, se ha cuantificado como un marcador subrogado de ADN tumoral en el plasma de los pacientes con cáncer nasofaríngeo¹¹⁰.

- **Técnicas utilizadas para la caracterización del ADN plasmático**

El desarrollo del cáncer habitualmente implica una acumulación de cambios genéticos y epigenéticos, tales como mutaciones, reordenamientos cromosómicos, inestabilidad de microsátélites e hipermetilación de promotores. Después de la primera demostración de secuencias detectables de ADN tumoral en el plasma de los pacientes con cáncer¹¹⁴, diferentes formas de ADN tumoral circulante se han detectado en pacientes con distintos tipos de tumores por varios grupos. Así, en los diferentes estudios realizados se han llegado a analizar un conjunto de alteraciones moleculares, demostrativas de las más habituales encontradas en el material genético tumoral.

Las mutaciones en oncogenes pueden ser encontradas en una amplia variedad de tumores, su detección en el ADN de plasma o suero aporta evidencia sobre el origen tumoral de los ácidos nucleicos circulantes. La familia de protooncogenes Ras forma parte de la cascada de señales de diferentes vías oncogénicas de proliferación tumoral. Las mutaciones de K-ras son unas de las alteraciones genéticas más comunes encontradas en tumores y fueron las primeras mutaciones encontradas en el ADN circulante extracelular en pacientes con cáncer. En 1994, se publicó la detección de mutaciones de N-ras en pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda¹⁶³ y en tumores de páncreas¹¹⁵. Más tarde se detectaron mutaciones de K-ras en el suero y plasma de pacientes con cáncer de colon^{124, 165}. Estas mutaciones pudieron ser detectadas en estadios precoces de la enfermedad, estadio A de Dukes y en fase preleucémica de los síndromes mielodisplásicos. Se observó una completa similitud entre las mutaciones en Ras en el ADN tumoral y en el ADN plasmático. En algunos de estos estudios, la persistencia de secuencias mutadas de K-ras circulantes se asoció con recaídas y/o progresión de la enfermedad.

TP53 es un gen supresor de tumores que interviene en la regulación de la proliferación celular. Sus mutaciones también se encuentran entre las más comunes detectadas en los cánceres humanos. Las mutaciones en TP53 se han detectado tanto por PCR-SSCP como por mutación específica en carcinoma microcítico de pulmón¹³⁹, en carcinoma de mama¹⁶⁶, adenocarcinoma de colon¹²⁵ y en hepatomas¹⁶⁷. La presencia de estas mutaciones en el ADN plasmático extracelular de los pacientes se asoció con tumores de mayor tamaño y estadios tumorales más avanzados¹³⁹.

Los reordenamientos cromosómicos representan otra clase de eventos que pueden ocurrir en los tumores. En el plasma y suero de pacientes con linfomas o leucemias se han detectado secuencias de ADN con reordenamientos en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas¹⁶⁸, además se observó una relación entre su persistencia tras el tratamiento con quimioterapia y la resistencia al mismo.

Las alteraciones detectadas mediante el estudio de microsatélites, tales como la pérdida de heterocigosidad y la inestabilidad de microsatélites, se encuentra prácticamente a lo largo de todo el genoma y en una gran variedad de tumores, en especial en el cáncer colorectal hereditario no polipósico, carcinoma colorectal esporádico, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer de vejiga y cáncer de mama. Estos hechos confirman que varios microsatélites distribuidos a lo largo del genoma, pueden estar en regiones habitualmente alteradas en muchos cánceres y pueden servir como marcadores clonales asociados a ese tumor. La primera descripción acerca del uso de marcadores polimórficos de microsatélite para identificar y caracterizar ADN extracelular circulante en pacientes con cáncer fue realizada en 1996^{169, 170}. Desde entonces, varios estudios de seguimiento, tales como el presente, han sido realizados para establecer el posible valor del ADN libre en plasma con características de ADN tumoral como factor pronóstico en pacientes diagnosticados de cáncer, pero ninguno con un seguimiento superior a 24 meses. Se ha publicado la presencia de alteraciones en microsatélites en ADN plasmático idénticas a las del ADN del tejido tumoral y diferentes a las del ADN linfocitario en carcinoma microcítico¹⁶⁹ y no microcítico de pulmón¹⁷¹, carcinoma de cabeza y cuello¹⁷², melanoma¹⁷³, hipernefoma¹⁷⁴, cáncer de colon¹⁷⁵ y cáncer de mama^{138, 164, 176}. En la mayoría de los estudios, los niveles y la persistencia de las alteraciones de microsatélites tuvieron correlación pronóstica con la progresión de la enfermedad o con el número de recaídas.

La metilación aberrante del promotor de genes supresores, como la hipermetilación, es un mecanismo epigenético que está adquiriendo una gran significación y que podría estar implicado en algunos procesos de tumorigénesis. La hipermetilación del promotor de algunos genes implicados en diversas vías de proliferación tumoral, como p16INK4a, DAP kinasa, GSTP1, MGMT y APC, ha sido identificada y ha hecho posible su estudio a nivel de ADN plasmático, comprobándose su relación con recaídas de la enfermedad, y una cierta predicción evolutiva en algunos

tumores como cáncer de pulmón no microcítico¹⁷⁷, cáncer de mama¹⁷⁸, carcinoma de cabeza y cuello¹⁷⁹, hepatoma¹⁸⁰, y esófago¹⁸¹.

En plasma de pacientes con neoplasias asociadas con infecciones víricas se han encontrado secuencias genómicas virales. En el suero de pacientes con carcinoma nasofaríngeo, con enfermedad de Hodgkin y en procesos linfoproliferativos post-trasplante se ha detectado ADN del virus Epstein-Barr (EBV)¹⁸². Aparte de su detección al diagnóstico, también se ha demostrado su utilidad en la monitorización y pronóstico de los pacientes con carcinoma nasofaríngeo y procesos linfoproliferativos asociados a EBV. La detección cuantitativa de secuencias de ADN del virus del papiloma humano (HPV) en el suero de los pacientes ha sido descrita como un marcador potencial para la enfermedad metastásica de los pacientes con tumores de cabeza y cuello asociados a HPV¹⁸³. Además, la detección de ADN del HPV en el plasma de las pacientes con cáncer de cérvix se asocia con la presencia de enfermedad metastásica¹⁸⁴.

- **Elección de marcador genético para la caracterización del ADN plasmático**

Con la incorporación de avances técnicos ha sido posible progresar en el estudio y en las aplicaciones de los ácidos nucleicos. Los primeros métodos como el radioinmunoensayo podían detectar sólo pequeñas cantidades en nanogramos de ADN, con capacidad de información añadida, esta relativa sensibilidad pudo haber contribuido a las bajas tasas encontradas en los primeros ensayos. Con la introducción de la técnica de la PCR, cantidades en picogramos ya pudieron ser detectadas y amplificadas. La robustez del análisis de microsatélites ha mejorado con técnicas de alelotipos basadas en fluorescencia con electroforesis capilar¹⁸⁵. En la mayoría de los estudios de detección viral, la positividad rondaba en torno al 50%, y con la actual técnica de PCR en tiempo real aumenta la sensibilidad hasta en un 90%. Sin embargo, dada la alta sensibilidad de la PCR cuantitativa, medidas eficaces anticontaminación deben ser estrictamente aplicadas en estos ensayos¹⁸⁶. Dentro del desarrollo de técnicas de complejidad asumible por los laboratorios centrales de rutina, el uso de técnicas no radioisotópicas puede facilitar la incorporación del análisis del ADN tumoral plasmático en el estudio y manejo de los pacientes con cáncer.

- **Papel de los marcadores genéticos utilizados**

En nuestra serie, analizamos muestras de ADN procedente del tejido tumoral y ADN sérico con marcadores polimórficos tipo microsatélite y determinando mutaciones en TP53.

En el grupo mayoritario de pacientes con ADN circulante, el 43% de ellas mostraban alteraciones moleculares en el plasma similares a las encontradas en el tejido tumoral y dichas alteraciones no se encontraron en ninguno de los controles sanos. Estos datos muestran similitud con los hallazgos de los estudios previamente mencionados.

Para el estudio del ADN plasmático, la elección de marcador es un factor importante y, nosotros decidimos analizar la pérdida de heterocigosidad y las mutaciones de TP53, dos parámetros moleculares, con la finalidad de aumentar la sensibilidad de las detecciones de ADN plasmático con características tumorales en la serie de pacientes. Aunque la capacidad de detectar ADN tumoral en plasma varía en función de la serie y el tipo tumoral, el uso conjunto de varios marcadores (microsatélites, mutaciones, hipermetilación) incrementa los porcentajes de detección.

Un estudio¹⁸⁷, en pacientes con cáncer de ovario, utilizó la detección de secuencias específicas de TP53 en plasma y líquido peritoneal, encontrándose solamente en el 15% de las pacientes, siendo la crítica principal al mismo la utilización de un solo marcador. Los autores señalan que es probable que el ADN circulante refleje la presencia de invasión vascular por parte de las células del cáncer de ovario, pero la escasa incidencia lo hace difícil de utilizar como test de rutina para la determinación del pronóstico de estas pacientes, ya que otras alteraciones moleculares además de las mutaciones en TP53 pueden estar presentes, siendo necesario usar además otros marcadores para aumentar la sensibilidad del test. Pese a todo el estudio demostró su asociación con peor supervivencia.

La capacidad de una alteración molecular para modificar el pronóstico de los pacientes depende de si esta alteración confiere un fenotipo tumoral más agresivo. Los

marcadores usados en este estudio para identificar pacientes con ADN libre plasmático con características tumorales pueden o no tener un efecto directo en el fenotipo del tumor, independientemente de que puedan ser encontrados en el plasma. Cuando analizamos la supervivencia global de las pacientes como una función de las LOH en ADN plasmático, los resultados fueron equivalentes a aquellos de la serie entera, porque la mayoría de las pacientes presentaban, al menos, una LOH. Sin embargo, el análisis de las mutaciones de TP53 es incierto, quizá por el pequeño número de pacientes. Tabla 8.

En cualquier caso, algunos estudios han observado que el pronóstico de los pacientes también puede tener una influencia dependiendo del marcador determinado en plasma, sugiriendo que los ácidos nucleicos libres circulantes pueden ser una buena fuente para obtener ácidos nucleicos tumorales^{139, 181}.

- **Origen y mecanismos de liberación del ADN plasmático**

Los mecanismos mediante los cuales el ADN tumoral llega y se mantiene en el plasma están poco comprendidos en el momento actual. Las hipótesis consideradas tienden a centrarse en apoptosis, necrosis y lisis tumoral, así como también por un proceso activo de liberación de ácidos nucleicos por las células tumorales, como ya se ha comentado en la Introducción. La presencia en el plasma de variables proporciones de ADN tumoral es probablemente el resultado de diferentes mecanismos, los cuales incluyen posiblemente, vías tanto de muerte celular como de proliferación. Algunas investigaciones en curso ofrecerán, próximamente, más información en este campo, tanto desde el punto de vista de su valor pronóstico al relacionar este parámetro molecular con la supervivencia de los enfermos, como respecto del origen y características biofísicas del ADN libre en plasma.

En nuestra serie, independientemente de si el valor pronóstico depende de su origen, la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico, analizado con un adecuado periodo de seguimiento se asoció con tumores más agresivos y a rangos de supervivencia más corta en pacientes con cáncer de mama.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS: UTILIDAD

- **Presencia de ADN tumoral plasmático y correlaciones clínico-patológicas**

La mayoría de los estudios que analizan la presencia de ADN circulante en plasma de pacientes con cáncer han descrito su presencia en el momento del diagnóstico de la neoplasia y en diferentes estadios de la misma, sugiriendo que puede ser un hecho temprano en la progresión tumoral. Las correlaciones efectuadas en algunos tumores entre ADN plasmático y parámetros histológicos del tumor, han revelado una asociación estadísticamente significativa con algunas características histológicas consideradas de mal pronóstico¹⁶⁴.

Uno de los objetivos de nuestro estudio fue determinar si la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico se asociaba con algunas de las características clínico-patológicas de las pacientes (Tabla 1). La edad media de la serie fue de 55 años, punto que se utilizó de corte para establecer el análisis univariante y multivariante de dicho parámetro. La detección del ADN tumoral plasmático fue similar en los dos grupos de edades analizados, por lo que la valoración del papel pronóstico del ADN tumoral dependiendo de la edad de las pacientes no se pudo realizar. La invasión vascular es uno de los parámetros histológicos que se analizan rutinariamente en las pacientes con cáncer de mama, pero con poco valor clínico en la decisión del tratamiento oncológico. En nuestra serie no se encontró que éste parámetro tuviera correlación con la presencia o no de ADN tumoral plasmático al diagnóstico. El grado histológico se relacionó con la presencia de ADN tumoral plasmático. El 55% de las pacientes con grado histológico 3 presentan ADN positivo frente al 31% de las pacientes con grados 1 y 2, sin embargo estas cifras no logran alcanzar significación estadística. El estudio de la afectación ganglionar axilar y su relación con la presencia de ADN tumoral plasmático no encontró diferencias significativas, pese a que un mayor porcentaje de pacientes con axila positiva presentaban ADN tumoral plasmático respecto a los que no tenían afectación axilar. El estadio tumoral, otro de los clásicos parámetros de mal pronóstico, sí se asoció a la presencia de ADN plasmático de una manera significativa ($p=0.018$). El estadio es la combinación de la afectación axilar y el tamaño tumoral y, pese a que por separado

no se ha visto una relación estadísticamente significativa de éstos parámetros con el ADN plasmático, al unirlos, ésta relación sí que se puede establecer. La relación significativa del estadio y el ADN, así como la que se observa con la afectación axilar, tamaño y grado histológico nos indica que el ADN tumoral plasmático presenta una asociación con la carga tumoral del paciente y probablemente con la agresividad del mismo.

Varios estudios han analizado la presencia de ADN tumoral plasmático en relación con el estadio de la enfermedad y los resultados no han sido uniformes. Dos estudios, en carcinoma de cabeza y cuello¹⁷⁰ y carcinoma microcítico de pulmón¹⁶⁹, ambos con gran número de pacientes señalaron la relación del ADN con enfermedad avanzada; sin embargo, otros cuatro estudios que analizaban esta característica molecular en diversos tumores como cáncer no microcítico de pulmón¹⁷⁷, cáncer de colon^{124, 125} y carcinoma de células renales¹⁷⁴ encontraron relación con su presencia y estadios iniciales. Así pues, los datos disponibles no son concluyentes, sugiriendo que otras características biológicas no exploradas de los ácidos nucleicos tumorales extracelulares pueden asociarse a este fenómeno. En un estudio previo realizado en nuestro Servicio¹⁶⁴ se compararon parámetros clínico-patológicos entre pacientes con cáncer de mama con y sin ADN tumoral plasmático al diagnóstico y se apreciaron diferencias significativas en cuanto a la afectación axilar, la presencia del tipo histológico carcinoma ductal invasivo, altos índices proliferación y el parámetro compuesto por afectación axilar, grado histológico III y afectación vascular peritumoral y, la presencia de ADN plasmático. Con los datos de nuestro estudio, podemos afirmar que la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico en pacientes con cáncer de mama, sí parece asociarse a algunas características histológicas de peor pronóstico.

- **Relación con la supervivencia libre de enfermedad a los tres años**

En el corte del estudio a los tres años se analizaron doce parámetros clínico-patológicos y la presencia de ADN plasmático en relación con la supervivencia libre de enfermedad. Conocemos que el comportamiento clínico del cáncer de mama puede ser predecido por factores pronósticos bien establecidos como el tamaño tumoral, la afectación ganglionar axilar y el estadio patológico. El grado histológico y los

receptores de estrógenos también son factores pronósticos evaluables. El estudio confirma el valor pronóstico de estos factores con la supervivencia libre de enfermedad a los tres años (Tabla 3), aunque el grado histológico y los receptores de estrógenos no demostraron un valor predictivo significativo para la supervivencia libre de enfermedad en nuestra serie ($p=0.8$ y $p=0.5$, respectivamente). La presencia de ADN plasmático al diagnóstico se relacionó con la supervivencia libre de enfermedad a los tres años, con una razón de riesgo de 2.6 cuando se comparaba con las pacientes sin la presencia de dicho factor molecular (Tabla 4). El tamaño tumoral mayor de 5 cm fue el factor con mayor razón de riesgo, seguido de la afectación ganglionar axilar y del ADN tumoral plasmático.

La asociación significativa encontrada entre la presencia de ADN plasmático con características de ADN tumoral y la supervivencia libre de enfermedad a tres años indica que este marcador tumoral tiene un papel pronóstico en las pacientes con cáncer de mama.

- **Relación con la supervivencia: resultados a cinco años**

En relación con los diversos estudios publicados sobre cáncer de mama y ADN circulante, éste es el estudio con mayor seguimiento. A los 5 años, recayeron el 24.6% de las pacientes, de las que fallecieron 30, tanto los datos de recaídas como de muertes fueron significativos respecto de la presencia de ADN circulante en plasma. Los datos de supervivencia de la serie se pueden considerar aplicables a la población general de pacientes con cáncer de mama en estadio inicial. Teniendo como referencia al estudio EUROCORE¹⁸⁸, que analiza la supervivencia en Europa de los pacientes con cáncer, la supervivencia global a 5 años observada en las pacientes de nuestro estudio demuestra una distribución similar al europeo (que describe una supervivencia los 5 años del 78%). Nuestro estudio refleja una ligera menor supervivencia a 5 años (supervivencia del 71%), que probablemente sea debido al menor porcentaje de pacientes en estadio I incluidos en nuestro este estudio.

Los datos sobre la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años son más concluyentes que los de los 3 años y, refuerzan el papel del ADN tumoral plasmático

como factor pronóstico. Las diferencias entre ambos (Tablas 2 y 5) son lógicas, ya que toda la serie tiene un mayor seguimiento y, nos señalan el error que se puede cometer al extrapolar datos de supervivencia en el seguimiento de pacientes en situaciones de adyuvancia. Las pacientes con ADN tumoral positivo tuvieron una supervivencia libre de enfermedad a los cinco años del 54% y, las pacientes en las que no se detectó del 86%, con una importante significación estadística ($p=0.0003$) (Figura 4A). En el análisis univariante el ADN plasmático tumoral, el tamaño, la afectación axilar y el estadio tuvieron un valor pronóstico significativo. Al realizar el análisis multivariante de los resultados, el único parámetro significativo en relación con la supervivencia libre de enfermedad fue el ADN positivo al diagnóstico ($p=0.038$). Los otros parámetros de mal pronóstico, como la afectación ganglionar axilar, el tamaño tumoral y el grado histológico no alcanzaron significación estadística (Tabla 6).

En nuestro estudio, respecto a la supervivencia global a los cinco años, con una media de seguimiento de 58 meses (rango: 37-82 meses), se observa una diferencia estadísticamente significativa en las pacientes con ADN tumoral positivo, así su supervivencia fue del 59% y, del 83% para las pacientes con ADN negativo al diagnóstico.

La probabilidad de recaída de las pacientes con ADN positivo era del 32%, respecto al 12% de las pacientes con ADN negativo. Al realizar el análisis univariante, el ADN plasmático y las variables edad, receptores de estrógenos, tamaño tumoral, afectación ganglionar axilar y estadio también fueron significativas.

Cuando se realizó el análisis multivariante, las variables receptores de estrógenos y tamaño tumoral mantuvieron su significación, pero no el ADN tumoral al diagnóstico. De acuerdo con el modelo univariante de regresión de Cox, el valor predictivo del ADN tumoral plasmático fue claramente significativo, con una razón de 2.5. Sin embargo, en el análisis multivariante disminuyó dicha razón a 1.6, probablemente debido al efecto confusor de las variables consideradas en este modelo estadístico (Tabla 7). Por lo tanto, mientras el análisis estadístico señaló que el ADN tumoral plasmático mantiene alguna relación con dichos factores, el método de Kaplan-Meier demostró diferencia significativa en el comportamiento entre las curvas de supervivencia de las pacientes con ADN positivo y negativo al diagnóstico. Es posible

que con un mayor seguimiento o con un mayor número de pacientes en la serie se hubiera alcanzado un valor significativo, dado que la tendencia es a la significación.

El parámetro con mayor significación en la supervivencia fue la variable receptores de estrógenos. En este caso, los resultados del estudio pueden estar influenciados por el tipo de análisis estadístico realizado y por el tratamiento administrado a las pacientes, tanto en el tratamiento hormonal adyuvante inicial, como el que se administró, cuando estuvo indicado, en la situación de diseminación de la enfermedad. Esto se debe a la posible existencia de variables confusoras que pueden modificar el riesgo relativo de la variable receptores de estrógenos; en este caso se observa una confusión negativa, probablemente llevada a cabo por la influencia de la variable tratamiento. El estudio del tamaño se realizó comparando las pacientes T3 con las T1, observando una probabilidad de supervivencia seis veces mayor en el segundo grupo y, obviando grupos intermedios como el T2, en los que se roza la significación sin llegar a alcanzarla. En cambio, en el análisis de la afectación axilar se estudió la presencia o ausencia de dicha afectación, y no la relación entre subgrupos de pronóstico más diferente como N0 con N2 o con N3, aun así la afectación axilar roza la significación en el análisis multivariante.

Del resto de parámetros analizados destaca la edad, que pese a que resultó significativa como factor pronóstico tanto en el análisis de la supervivencia libre de enfermedad como de la supervivencia global a los cinco años y rozando la significación en el análisis multivariante, confirmando un peor pronóstico para las pacientes con edad inferior a 55 años, esta significación no se obtuvo cuando se analizó el estado menstrual premenopáusico frente a postmenopáusico.

Pese a los numerosos estudios realizados sobre el ADN tumoral plasmático desde 1996, cuando el ADN circulante plasmático extracelular fue por primera vez caracterizado como ADN del tumor, la gran mayoría de ellos analizan su relación con otros factores clínico-patológicos ya reconocidos, sin realizar seguimiento de la serie de pacientes objeto del estudio. Pocos estudios han señalado la correlación del pronóstico de los pacientes con la presencia de ADN con características tumorales en sangre periférica, probablemente por el seguimiento que esto conlleva. Hasta la actualidad, los estudios que recogen esta información analizan tumores con escasa supervivencia, como

el carcinoma microcítico de pulmón¹³⁹ y el carcinoma de páncreas¹⁸⁹. Este último estudio, que analiza un grupo de 44 pacientes con adenocarcinoma de páncreas con un seguimiento medio de 7 meses, objetiva una menor supervivencia en los pacientes con ADN libre en el plasma. Los estudios con adecuado número de pacientes y seguimiento son escasos. Otros estudios en adenocarcinoma de esófago¹⁸¹ y carcinoma no microcítico de pulmón¹⁹⁰ y, el estudio presente han considerado periodos de seguimiento largos y han demostrado también una correlación positiva entre pobre supervivencia y la presencia de ADN plasmático. Independientemente de los mecanismos de producción y los marcadores moleculares usados, la presencia del ADN plasmático puede ser considerada un factor pronóstico negativo.

No todos los estudios ofrecen resultados positivos. Un estudio¹⁹¹ no encontró asociación entre el pronóstico clínico de las pacientes y la presencia de ADN plasmático. Aunque en este caso la serie fue de 16 pacientes, se concluye la no utilidad para la detección de metástasis ocultas o la monitorización de la enfermedad.

- **Valor del ADN tumoral plasmático, relación con carga tumoral y otros factores pronósticos**

El tratamiento adyuvante sistémico en el cáncer de mama está indicado en los grupos de pacientes con mayor riesgo de recidiva tumoral y, la decisión de su administración se basa en una combinación de factores pronósticos encabezados por la afectación axilar y el tamaño tumoral. Estos parámetros que nos ayudan a la toma de decisiones no permiten discriminar a un subgrupo de pacientes, que es considerado de buen pronóstico pero que va a presentar una recaída de su enfermedad. Dado que la presencia o ausencia de afectación ganglionar axilar es el factor pronóstico más importante en las pacientes con cáncer de mama no metastásico, se estudió su relación con la presencia o no de ADN tumoral al diagnóstico, su efecto en la supervivencia y su poder para discriminar grupos de mejor pronóstico dentro de los grupos de pacientes separados por la afectación axilar. Así, en el grupo considerado de mejor pronóstico, sin afectación axilar, el ADN tumoral plasmático no fue capaz de diferenciar subgrupos de distinta evolución (Figura 6A). En cambio, en el grupo con afectación axilar, de peor pronóstico, las pacientes que tenían el ADN tumoral plasmático positivo sí que

presentaban una tendencia a peor supervivencia, permitiendo la identificación de un subgrupo de peor pronóstico (Figura 6B). Nuestro marcador a estudio no nos permitió discriminar un subgrupo de peor evolución dentro de los grupos de buena evolución.

La afectación axilar sólo refleja de una manera indirecta la tendencia del tumor a la diseminación, ya que en los estadios más precoces, sin afectación axilar, hasta el 30% de las pacientes van a recaer. El tratamiento de estas pacientes que se encuentran en estadios muy iniciales supone una difícil decisión para el oncólogo por el riesgo de sobretratar a pacientes con escaso riesgo de recidiva tumoral o por el de infratrar a pacientes que, pese a tener poco riesgo según los factores pronósticos habituales, sí que tienen posibilidades de recaer. En busca de conocer la utilidad del ADN tumoral en esta situación, dividimos a las pacientes en estadios más precoces, sin afectación axilar y con reducido tamaño tumoral (T1-T2), llamados pacientes con baja carga tumoral. Dado que en esta situación se buscan más factores pronósticos que nos ayuden a tomar decisiones de tratamiento, analizamos también el papel del grado histológico en esta situación. El grado histológico es probablemente el tercer factor pronóstico en consideración, junto con el estado de los receptores hormonales, y hemos comparado su papel con el del ADN plasmático tumoral para evaluar si este podría sustituirlo en la toma de decisiones. En las pacientes sin afectación axilar y T1-T2 se producen seis fallecimientos, tres de las cuales tenían ADN positivo y otras tres, negativo; por lo que la presencia o no de ADN tumoral plasmático no permite discriminar ningún subgrupo pronóstico. El número de fallecidos en este subgrupo de buen pronóstico es escaso y probablemente ningún marcador resultara significativo. Cuando se estudió el grado histológico tampoco éste fue capaz de diferenciar a las pacientes con probabilidad de recaer. Las gráficas 7 y 8 muestran que tanto el ADN tumoral al diagnóstico como el grado histológico no discriminan subgrupos de pacientes en el grupo de pacientes con buen pronóstico; sin embargo, ambas variables son capaces de seleccionar a subgrupos de pacientes de peor pronóstico en el grupo de pacientes de mal pronóstico, determinado por la afectación axilar y el tamaño tumoral.

Se ha analizado la relación entre el tratamiento administrado y su influencia en la supervivencia según la presencia o no de ADN tumoral plasmático. Dada la complejidad del tratamiento del cáncer de mama, las pacientes se dividieron en ocho subgrupos (ver Material y Métodos), pero a la hora de realizar el estudio sólo se analizaron cuatro grupos de tratamiento, ya que el resto de grupos no tenía número

suficiente de pacientes que hiciera posible su análisis. En los grupos de pacientes tratadas con quimioterapia más radioterapia y, radioterapia más hormonoterapia, el ADN permitió discriminar subgrupos de peor pronóstico (Figura 9). Esto no se obtuvo en el grupo de tratamiento con hormonoterapia, considerado como de mejor pronóstico.

Para simplificar el estudio analizamos por separado las pacientes tratadas sólo con quimioterapia o con hormonoterapia. En el grupo de pacientes que recibió quimioterapia, que habitualmente se administra a las pacientes que presentan factores de mal pronóstico, aquellas pacientes con ADN tumoral positivo tienen una tendencia a un peor pronóstico, con una $p=0.08$ (Figura 10A). En el grupo de pacientes que recibió hormonoterapia, considerado a priori de mejor pronóstico, el ADN tumoral positivo no permitió la identificación de ningún subgrupo de peor evolución; $p=0.16$, esta diferencia no fue significativa (Figura 10B). En nuestra serie de pacientes, independientemente del tratamiento administrado, la presencia de ADN tumoral plasmático indica peor pronóstico y, en los grupos de mejor pronóstico no nos discrimina subgrupos de peor evolución.

En nuestro estudio, el análisis de la capacidad de discriminación del ADN libre plasmático dio distintos resultados en los dos grupos de pacientes seleccionados en base a la supervivencia global tras 5 años de seguimiento medio (Figuras 11A y 11B). Estas diferencias son difíciles de interpretar y deben ser consideradas en el contexto de unos resultados preliminares dentro del efecto de un esquema específico de tratamiento en la supervivencia de pacientes con peor pronóstico, indicado por la presencia del factor molecular. En este estudio el factor molecular fue ADN plasmático libre con características tumorales. Los tratamientos adyuvantes han demostrado modificar la supervivencia de las pacientes con cáncer¹⁹². En este escenario existe la necesidad de más estudios con adecuadas series de pacientes para determinar si el ADN libre plasmático pudiera ser un marcador de respuesta al tratamiento de las pacientes con cáncer de mama, como se ha demostrado en otros tumores.

Así pues, cuando se analiza la relación del ADN tumoral plasmático con otros factores de mal pronóstico como la afectación axilar y carga tumoral, o con otras situaciones que indirectamente indican mal pronóstico como la administración de determinados tratamientos sistémicos (quimioterapia u hormonoterapia) o con los

grupos que de acuerdo con el tratamiento recibido han evolucionado peor, se observa que el ADN tumoral plasmático al diagnóstico es un factor de mal pronóstico y, que es capaz de discriminar subgrupos de pacientes dentro de los grupos de pacientes de mal pronóstico, que pese al tratamiento estándar administrado evolucionan peor. No podemos asumir que un tratamiento más intenso en estos subgrupos de pacientes, identificados por la presencia de ADN tumoral plasmático al diagnóstico, pudiera cambiar la evolución de las mismas, pero sí que el tratamiento administrado en la actualidad no logra una buena supervivencia en estos subgrupos de mal pronóstico.

La asociación significativa que hemos encontrado entre la presencia de ADN plasmático con características tumorales agresivas y la recurrencia de la enfermedad, así como su capacidad de predecir la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global indica que esta alteración molecular podría usarse como factor pronóstico, que la presencia de ADN tumoral plasmático en pacientes con cáncer de mama en el momento del diagnóstico es un predictor fiable de supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y recaída, pero sin embargo no aporta más utilidad a los otros factores pronósticos ya existentes y no hemos podido demostrar que sea complementario a ninguno de ellos cuando se estudia en conjunto su utilidad en la discriminación de subgrupos de buen pronóstico. Hemos visto relación del marcador con situaciones clínicas de elevada carga tumoral y de mal pronóstico, seleccionando en estos casos grupos de pacientes con peor evolución.

La técnica es factible y rápida, no modificada por otros factores, ya que la muestra de sangre se recoge antes de realizar ningún tratamiento, incluyendo la cirugía.

Los resultados de este estudio refuerzan los de los otros estudios en carcinomas de páncreas, adenocarcinomas de esófago, cáncer de pulmón no microcítico y melanoma, teniendo en cuenta que nuestro estudio tiene un seguimiento más adecuado al tipo de tumor considerado que el resto de los estudios comentados.

Ningún otro estudio ha alcanzado un seguimiento ni un número de pacientes mayor que el nuestro. La importancia de nuestro estudio radica en el seguimiento de cinco años, que puede considerarse revelador de la evolución de las pacientes con cáncer de mama no metastásico, y nos ofrece unos datos de supervivencia, tanto libre de

enfermedad como global, de la que carecen el resto de los estudios. En un futuro próximo dispondremos de resultados de otros estudios, actualmente en curso, en nuestro Servicio, que analizan como parámetro principal, la supervivencia de las pacientes en relación con la presencia en plasma de ARN tumoral en el momento del diagnóstico.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Con el desarrollo de la Biología Molecular se dispone de nuevas herramientas que pueden proporcionar perfiles moleculares que colaboren en una mejor caracterización de tumores y en una mayor precisión pronóstica. Desafortunadamente, no existe un marcador molecular único que proporcione suficiente información para ayudar al clínico a realizar diagnósticos más precisos y pronósticos más efectivos. En su lugar, deben ser evaluados paneles de marcadores que identifiquen diferentes vías implicadas en progresión tumoral como mutaciones en ciertos de genes, sobreexpresión o disminución de la expresión de la actividad de algunos genes, análisis de proteínas específicas o la detección de ácidos nucleicos circulantes. En nuestro estudio se ha evaluado la presencia de ADN tumoral libre en plasma usando alteraciones genéticas específicas del tumor para su caracterización. Pese a los datos positivos encontrados en recaídas y supervivencia en pacientes con cáncer de mama, que lo avalan su papel como marcador tumoral, sabemos que otros muchos marcadores influyen en la posterior evolución de las enfermas.

El estudio del ADN tumoral plasmático puede proporcionar un nuevo marcador molecular con implicaciones pronósticas en pacientes con cáncer de mama. Es posible que el ADN tumoral circulante libre pueda servir como un marcador molecular fiable y accesible, como se ha sugerido en este y en otros estudios, por lo que se puede postular su utilidad para la detección precoz y el seguimiento de las pacientes con cáncer. Al ser un método no invasivo, puede ser más fácilmente aceptado para la detección precoz de la enfermedad, en este caso, si los resultados de este procedimiento fueran consistentemente establecidos en estadio I o en tumores menores de 1cm, podría considerarse un método complementario a los procedimientos radiológicos habituales. Además, la identificación de lesiones premalignas con alteraciones moleculares definidas¹⁹³ permitiría la investigación de este marcador molecular en pacientes con lesiones premalignas e, hipotéticamente cambiaría el manejo clínico de estos procesos.

En relación con el tratamiento del cáncer de mama se ha estudiado la persistencia del marcador tras la mastectomía. En un estudio¹²⁷ se encontró persistencia de ADN tumoral plasmático tras la mastectomía en el 20% de las pacientes, sobre todo

en los que presentaban invasión vascular, afectación ganglionar axilar y alto grado histológico. Estos resultados sugieren que la persistencia de ADN tumoral plasmático tras la mastectomía podría identificar a un grupo de pacientes con enfermedad más agresiva con mayor tendencia a la aparición de diseminación micrometastásica. Estudios prospectivos deben validar esta observación preliminar. También se ha observado que tras el tratamiento adyuvante, el ADN tumoral plasmático no desaparece en todas las pacientes. En un estudio¹⁹⁴ en pacientes con cáncer de mama no diseminado, se objetivó la persistencia del marcador a los seis meses del tratamiento quirúrgico inicial y, tras haber recibido tratamiento adyuvante, en el 15% de las pacientes. En el momento del estudio, en ninguna de ellas se había detectado recurrencia o enfermedad metastásica. El hecho de la persistencia del marcador tumoral se podría explicar por una disminución de la actividad degradante de las nucleasas, que conllevaría a un lento aclaramiento del ADN plasmático o bien, que indicara la presencia de enfermedad micrometastásica, lo cual, de confirmarse podría suponer la utilidad del marcador como indicador de la eficacia del tratamiento adyuvante, que tendría que validarse en estudios prospectivos. En un estudio similar¹¹⁷ en el que se analizaron las variaciones séricas del ADN del virus Epstein-Barr en pacientes con carcinoma nasofaríngeo, se observaron fluctuaciones tras el tratamiento con radioterapia y se documentó persistencia de la enfermedad en pacientes que no mostraron regresión de esta alteración molecular, sugiriendo así su uso para la monitorización de la enfermedad y la detección precoz de las recaídas.

La utilidad del ADN tumoral plasmático en la monitorización del tratamiento adyuvante hormonal también se ha evaluado. En un estudio¹⁴⁵, los autores determinan como marcador la metilación RASSF1A DNA en un grupo de pacientes con cáncer de mama no metastásico, antes y tras un año de iniciar tratamiento adyuvante hormonal con tamoxifeno, resultando como marcador significativo de mal pronóstico, recaída y muerte cuando persiste o reaparece durante el seguimiento de las pacientes, sugiriendo que estas pacientes podrían beneficiarse de un cambio de tratamiento a inhibidores de la aromatasas, fármacos que están adquiriendo un papel cada vez más importante en la adyuvancia del cáncer de mama¹⁹⁵.

Quizá la principal implicación del estudio sea la posibilidad de tener un test no invasivo, basado en ADN plasmático, para el diagnóstico del cáncer, lo cual sería de

gran utilidad sobre todo en tumores con difícil diagnóstico (ej.: cáncer de páncreas). La relación entre ADN tumoral plasmático y el estadio tumoral, la presencia de enfermedad residual y su relación con la supervivencia sugiere que el ADN plasmático podría servir como marcador pronóstico en ausencia de metástasis clínicamente detectables y, como test de seguimiento para valorar la respuesta al tratamiento y la identificación de recaídas locales y a distancia. Para aumentar su sensibilidad es necesario analizar en cada tipo de tumor cual es el marcador genético adecuado para el estudio. Estudiando su asociación con lesiones premalignas y con la detección precoz del cáncer, se puede comprender mejor su papel a nivel diagnóstico y como método de cribaje del cáncer.

Además de la detección de ADN tumoral plasmático, existen otros métodos de estudio de los ácidos nucleicos. La detección de ARN ha sido descrita en numerosos tumores y, pese a la idea inicial de que su inestabilidad y rápida degradación supondría un inconveniente para su utilización, se ha demostrado que puede ser fácilmente extraíble y amplificable¹⁹⁶. Al igual que con el ADN plasmático, se ha encontrado en el plasma y en el suero de individuos sanos y, en cifras más elevadas en pacientes con cáncer. También se ha objetivado su relación con parámetros clínico-patológicos y con el pronóstico en pacientes con tumores¹⁹⁷. En el caso del cáncer de mama, se ha observado su asociación con parámetros de mal pronóstico como tamaño tumoral e índice de proliferación, así como con la presencia de células tumorales circulantes¹⁹⁸. El ADN mitocondrial puede suponer otra fuente de ADN con características tumorales. Se han descrito mutaciones en ADN mitocondrial en numerosos tumores¹⁹⁹, y en cáncer de mama se ha relacionado la presencia de mutaciones somáticas con mal pronóstico²⁰⁰. Otro método molecular muy estudiado en sangre periférica y en médula ósea, como técnica para el análisis de la presencia de células del tumor fuera de su lugar de origen, es el estudio de las células tumorales circulantes. Si la presencia de estas células indica el primer paso de la enfermedad metastásica o, por el contrario, es un paso por la circulación sin trascendencia en la diseminación de la enfermedad, es un tema pendiente de aclarar²⁰¹. En el cáncer de mama, se han usado como marcadores citoqueratinas expresadas exclusivamente por las células epiteliales y la mamaglobina, altamente específica de las células derivadas del tejido mamario, tanto tumoral como benigno. Cuando se han estudiado las células tumorales circulantes en sangre periférica y en médula ósea, su relación con el pronóstico y con otros parámetros clínicos es variable. Diversos estudios^{202, 203} han correlacionado la detección de células tumorales circulantes

con estadios más avanzados y con la afectación axilar ganglionar. Sin embargo, otro estudio²⁰⁴ no ha encontrado relación con la supervivencia libre de enfermedad ni con la afectación axilar ganglionar, pero su presencia disminuía con el tratamiento. El uso del marcador analizado también es de gran importancia, un estudio²⁰⁵ encuentra significación para la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama no metastásico, pero no para la supervivencia global, usando células positivas para mamaglobina mediante RT-PCR, pero no cuando usa citoqueratinas en las mismas muestras, señalando así las diferencias biológicas entre los distintos marcadores moleculares. En un análisis prospectivo¹⁰⁴, se evaluó el pronóstico de pacientes con cáncer de mama metastásico con el nivel de células tumorales circulantes en las pacientes, previo a iniciar un nuevo tratamiento sistémico y, se observó su relación con el intervalo libre de progresión y la supervivencia global.

El descubrimiento del ADN circulante ha abierto nuevas posibilidades como un método no invasivo para la detección y monitorización de diversas enfermedades. En los pacientes con cáncer, la detección y cuantificación de estos ácidos nucleicos es un método que, como ya se ha comentado, puede tener su utilidad en el pronóstico de los pacientes. En Obstetricia y Pediatría, el descubrimiento de ADN fetal en el plasma materno abre nuevas oportunidades como método no invasivo para el diagnóstico prenatal y la monitorización. Puede resultar de utilidad en casos de aneuploidías cromosómicas, preeclampsia y hemorragia fetal-materna²⁰⁶. En Traumatología, las concentraciones de ADN circulante se correlacionan con la severidad del traumatismo²⁰⁷. En Neurología, altos niveles de ADN plasmático se asocian con la gravedad e incluso con la mortalidad de los pacientes que sufren un accidente cerebrovascular²⁰⁸.

Los datos del presente estudio demuestran que mediante una sencilla metodología (extracción sanguínea) es posible el estudio de las alteraciones genéticas presentes en las células tumorales, que ADN tumoral circulante está presente en el plasma de las pacientes con cáncer de mama y, que éste se puede amplificar y detectar mediante PCR. El estudio de las alteraciones específicas, como las alteraciones de microsatélites y mutaciones del gen TP53, que se encuentran en el ADN plasmático permite su comparación con las del ADN del propio tumor, probando así su origen tumoral, y su valor como marcador pronóstico.

CONCLUSIONES

- 1- La detección, análisis y caracterización de ADN libre en plasma es factible utilizando la metodología adecuada.
- 2- En pacientes con cáncer de mama es posible detectar, en sangre periférica, ADN tumoral extracelular con las mismas alteraciones genéticas que las observadas en el tumor primitivo. Este hecho apoya la utilidad del plasma/suero como una fuente de ácidos nucleicos tumorales en estos pacientes.
- 3- La presencia de ADN tumoral extracelular se asocia con características histológicas del tumor de mal pronóstico como afectación axilar ganglionar, el tamaño tumoral y el grado histológico.
- 4- Existe una correlación entre las pacientes con recaídas de la enfermedad y la presencia de ADN tumoral extracelular al diagnóstico, tanto en los análisis realizados a los tres como a los cinco años.
- 5- La supervivencia libre de enfermedad a los tres y cinco años es más corta en aquellas pacientes con ADN tumoral circulante al diagnóstico.
- 6- Las pacientes con ADN tumoral circulante al diagnóstico tienen una tendencia a presentar una menor supervivencia global a los cinco años.
- 7- El pacientes con baja carga tumoral (sin afectación axilar y tamaño tumoral T1-T2) el ADN tumoral circulante al diagnóstico no tiene valor para discriminar pacientes peor pronóstico.
- 8- En los grupos de pacientes de mal pronóstico, el ADN tumoral es capaz de discriminar subgrupos con peor supervivencia.
- 9- La presencia de ADN tumoral en un grupo de pacientes sometidos a una misma pauta de tratamiento es capaz de discriminar subgrupos con diferente supervivencia global.

- 10- La determinación de ADN libre en plasma con presencia de alteraciones tumorales no ha demostrado mayor utilidad pronóstica que los factores pronósticos tradicionales en el manejo clínico de las enfermas con cáncer de mama.

BIBLIOGRAFÍA

-
- 1.- WHO World health organization. <http://www.who.int/cancer/en>
 - 2.- Quinn MJ, d'Onofrio A, Moller B et al. Cancer mortality trends in EU and acceding countries up to 2015. *Ann Oncol* 2003; 14: 1148-1152.
 - 3.- Boyle P and Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-488.
 - 4.- Mortalidad por cáncer y otras causas en España, año 2004. Area de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. <http://www.cne.isciii.es>
 - 5.- Henderson BE, Pike MC, Bernstein L, Ross RK. Breast cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds.: *Cancer Epidemiology and Prevention*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1996, pp 1022- 1039.
 - 6.- Del Moral A, Aupee M, Batal-Steil D, et al. Cancer screening in the European Union. *Eur J Cancer* 1994; 30: 870-872.
 - 7.- American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2397-2406.
 - 8.- Koh DM, Cook GJ and Husband JE. New Horizons in Oncologic Imaging. *N Eng J Med* 2003; 348: 2487-2488.
 - 9.- Bottomley A. Depression in cancer patients: a literature review. *Eur J Cancer Care* 1998; 7: 181-191.
 - 10.- Hanke JH, Webster KR, Ronco LV. Protein biomarkers and drug design for cancer treatments. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 297-305.
 - 11.- Newell DR. How to develop a successful cancer drug molecules to medicines or targets to treatments? *Eur J Cancer* 2005; 41: 676-682.
 - 12.- Mocellin S, Provenzano M, Rossi CR, et al. DNA array-based gene profiling: from surgical specimen to the molecular portrait of cancer. *Ann Surg* 2005; 241: 16-26.
 - 13.- WHO World health organization. Mortality database. <http://www-depbd.iarc.fr/who/menu.htm>.
 - 14.- Botha JL, Bray F, Sankila R, et al. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1718-1729.
 - 15.- Key TJ, Verkasalo PK, Banks E, et al. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2001; 2: 133-140.
 - 16.- Jemal, A, Murray, T, Ward, W, et al. Cancer statistics 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30.

-
- 17.- Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, et al. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993; 15:17-35.
- 18.- Kelsey JL, Fischer DB, Holford TR, et al. Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67:327-333.
- 19.- Healey EA, Cook EF, Orav EJ, et al. Contralateral breast cancer: clinical characteristics and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1545-1552.
- 20.- Magnusson C, Colditz G, Rosner B, et al. Association of family history and other risk factors with breast cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control* 1998; 9: 259-267.
- 21.- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358: 1389-1399.
- 22.- Whittemore AS. Risk of breast cancer in carriers of BRCA gene mutations. *N Engl J Med* 1997; 337: 788-789.
- 23.- Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol* 2005; 23: 276-292.
- 24.- Fackenthal J, Marsh D, Richardson A, et al. Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations. *J Med Genet* 2001; 38: 159-164.
- 25.- Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985; 312: 146-151.
- 26.- Marshall LM, Hunter DJ, Connolly JL, et al. Risk of breast cancer associated with atypical hyperplasia of lobular and ductal types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 297-301.
- 27.- Boyd NF, Dite GS, Stone J, et al. Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 886-894.
- 28.- Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, et al. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer* 1990; 46: 796-800.
- 29.- Bruzzi P, Negri E, La Vecchia C, et al. Short term increase in risk of breast cancer after full term pregnancy. *BMJ* 1988; 297: 1096-1098.
- 30.- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360: 187-195.

-
- 31.- Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 36-47.
- 32.- Key T, Appleby P, Barnes I, et al. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 606-616.
- 33.- Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, et al. Breast cancer. *N Engl J Med* 1992; 327: 319-328.
- 34.- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 1996; 347: 1713-1727.
- 35.- Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 2025-2032.
- 36.- Beral, V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362: 419-427.
- 37.- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348: 1625-1638.
- 38.- McTiernan A, Kooperberg C, White E, et al. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *JAMA* 2003; 290: 1331-1316.
- 39.- Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 2001; 286: 2143-2151.
- 40.- Guibout C, Adjadj E, Rubino C, et al. Malignant breast tumors after radiotherapy for a first cancer during childhood. *J Clin Oncol* 2005; 23: 197-204.
- 41.- Millar AB, Howe GR, Sherman GJ, et al. Mortality from breast cancer after irradiation during fluoroscopic examination in patients being treated for tuberculosis. *N Engl J Med* 1989; 321: 1285-1290.
- 42.- Abrahamsen JF, Anderson A, Hannisdal E, et al. Second malignancies after treatment of Hodgkin's disease: the influence of treatment, follow-up time and age. *J Clin Oncol* 1993; 11: 255-260.
- 43.- Gail MH, Brinton LA, Byar DP, et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1879-1886.

-
- 44.- Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* 1994; 73: 643-651.
- 45.- Wood W, Muss H, Solin L, et al. Cancer of the breast. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds.: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 7th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, pp 1415-1477.
- 46.- Singletary E, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3628-3636.
- 47.- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. An overview of the randomized trials. *N Engl J Med* 1995; 333: 1444-1455.
- 48.- Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1233-1241.
- 49.- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Favorable and unfavorable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet* 2000; 355: 1757-1770.
- 50.- Olivetto IA, Bajdik CD, Plenderleith IH, et al. Adjuvant systemic therapy and survival after breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 805-810.
- 51.- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 352: 930-942.
- 52.- Martin M, Pienkowski T, Mackey J, et al. Breast Cancer International Research Group 001 Investigators. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 2302-2313.
- 53.- Spicer J, Harries M, Ellis P. Adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer. *Lancet* 2005; 366: 634.
- 54.- Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 188-194.
- 55.- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 351: 1451-1467.
- 56.- Impact of follow-up testing on survival and health-related quality of life in breast cancer patients. A multicenter randomized controlled trial. The GIVIO Investigators. *JAMA* 1994; 271: 1587-1592.
- 57.- Roselli del Turco M, Palli D, Cariddi A, et al. Intensive diagnostic follow-up after treatment of primary breast cancer. *JAMA* 1994; 271: 1593-1597.

-
- 58.- Joseph E, Hyacinthe M, Lyman GH, et al. Evaluation of an intensive strategy for follow-up and surveillance of primary breast cancer. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 552-527.
- 59.- Jager W, Kramer S, and Lang N: Disseminated breast cancer: does early treatment prolong survival without symptoms? *Breast* 1995; 4: 65a.
- 60.- Saphner T, Tormey DC, et Gray R: Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2738-2746.
- 61.- Smith TJ, Davidson NE, Schapira DV, et al. American Society of Clinical Oncology 1998 update of recommended breast cancer surveillance guidelines. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1080-1082.
- 62.- Newcomb PA, Weiss NS, Storer BE, et al. Breast self-examination in relation to the occurrence of advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 260-265.
- 63.- Oestreicher N, White E, Lehman CD, et al. Predictors of sensitivity of clinical breast examination (CBE). *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76: 73-81.
- 64.- Fletcher SW, Black W, Harris R, et al. Report of the International Workshop on Screening for Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1644-1656.
- 65.- Kriege M, Brekelmans CT, Boetes C, et al. Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N Engl J Med* 2004; 351: 427-437.
- 66.- U.S. Preventive Services Task Force. *Guide to Clinical Preventive Services, Second Edition*. Washington, DC: Office of Disease Prevention and Health Promotion; 1996.
- 67.- Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, et al. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 141-169.
- 68.- Ernster VL, Barclay J, Kerlikowske K, et al. Incidence of and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast. *JAMA* 1996; 275: 913-918.
- 69.- NIH Consensus Conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA* 1991; 265: 391-395.
- 70.- Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, et al. Relation of the number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; 52: 1551-1557.
- 71.- Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11: 2090-2100.
- 72.- Clayton F. Pure mucinous carcinomas of the breast: morphologic features and prognostic correlates. *Hum Pathol* 1986; 17: 34-38.

-
- 73.- Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, et al. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1,262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989; 64: 1914–1921.
- 74.- Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, et al. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1239–1251.
- 75.- Bryant J, Fisher B, Gunduz N, et al. S-phase fraction combined with other patient and tumor characteristics for the prognosis of node-negative, estrogen-receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51: 239–253.
- 76.- Fisher B, Redmond C, Fisher ER, et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node-negative breast cancer patients. Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1076–1087.
- 77.- Bertucci F, Nasser V, Granjeaud S, et al. Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 863–872.
- 78.- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999–2009.
- 79.- Winstanley J, Cooke T, Murray GD, et al. The long term prognostic significance of c-erb-2 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63: 447–450.
- 80.- Stephens RW, Brunner N, Janicke F, et al. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 99–111.
- 81.- Zellars RC, Hilsenbeck SG, Clark GM, et al. Prognostic value of p53 for local failure in mastectomy-treated breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1906–1913.
- 82.- Chrzan P, Skolowski J, Karmolinski A, et al. Amplification of c-myc gene and overexpression of c-Myc protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue. *Clin Biochem* 2001; 34: 557–562.
- 83.- Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG: The bcl-2 protein: A prognostic indicator strongly related to p53 in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 499–504.
- 84.- Drobnjak M, Cote RJ, Saad AD, et al. p53 and Rb alterations in primary breast carcinoma: correlation with hormone receptor expression and lymph node metastases. *Int J Oncol* 1993; 2: 173–178.
- 85.- Debies MT, Welch DR. Genetic basis of human breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 441–451.

-
- 86.- Verrelle P, Meissonier F, Fonck Y, et al. Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance p-glycoprotein in breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 111-116.
- 87.- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536.
- 88.- Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1566-1575.
- 89.- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, et al. Catepsin and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 297-302.
- 90.- Schwartz L, Koerner F, Edgerton S. pS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 624-628.
- 91.- Hurlimann J, Gebhard S, Gómez F. Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27, and cathepsin D in invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology* 1993; 23: 239-248.
- 92.- Heimann R, Lan F, McBride R, et al. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* 2000; 60: 298-304.
- 93.- Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993; 71: 1368-1382.
- 94.- Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, et al. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1749-1756.
- 95.- Kokko R, Holli K, Hakama M. Ca 15-3 in the follow-up of localised breast cancer: a prospective study. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1189-1193.
- 96.- Gion M, Mione R, Leon AE, et al. CA27.29: a valuable marker for breast cancer management. A confirmatory multicentric study on 603 cases. *Eur J Cancer* 2001; 37: 355-363.
- 97.- Guadagni F, Ferroni P, Carlini S, et al. A re-evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) as a serum marker for breast cancer: a prospective longitudinal study. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2357-2362.
- 98.- Molina R, Filella X, Zanon G, et al. Prospective evaluation of tumor markers (c-erbB-2 oncoprotein, CEA and CA 15.3) in patients with locoregional breast cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 1043-1050.
- 99.- Robert C, Bast J, Ravdin P, et al. 2000 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast and Colorectal Cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1865-1878.

-
- 100.- Molina R, Duffy MJ, Aronsson AC, et al. Tumour markers in breast cancer. EGTM recommendations. *Anticancer Res* 1999; 19: 2803–2805.
- 101.- Johnson PJ, Dennis YM. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem* 2002; 48:1186-1193.
- 102.- Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5: 79-88.
- 103.- Lambrechts AC, Bosma A, Klaver S, et al. Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 56: 219-231.
- 104.- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781-791.
- 105.- Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clin Biochem* 2004; 37: 249-257.
- 106.- Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1113-1124.
- 107.- Jotsuka T, Okumura Y, Nakano S, et al. Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer. *Surgery* 2004; 135: 419-426.
- 108.- Alix-Panabieres C, Brouillet JP, Fabbro M, et al. Characterization and enumeration of cells secreting tumor markers in the peripheral blood of breast cancer patients. *J Immunol Methods* 2005; 299: 177-188.
- 109.- Thurm H, Ebel S, Kentenich C, et al. Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2598-2604.
- 110.- Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev* 2002; 28: 255-271.
- 111.- Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 1948; 142: 241–243.
- 112.- Tan E, Schur P, Carr R, et al. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966; 45:1732–1740.
- 113.- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff, DM, et al. DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650.

-
- 114.- Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46: 318-322.
- 115.- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 67-71.
- 116.- Kamm RC, Smith AG. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem* 1972; 18: 519-522.
- 117.- Lo YM, Chan LY, Chan AT, et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free-Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 5452-55.
- 118.- Lo YM, Leung SF, Chan LY, et al. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 2351-2355.
- 119.- Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-1665.
- 120.- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51: 2116-2120.
- 121.- Silva JM, Rodriguez R, Garcia JM, et al. Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. *Gut* 2002; 50: 530-534.
- 122.- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, et al. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 1998; 17: 89-97.
- 123.- Kopeski MS, Benko FA, Borys DJ, et al. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 918-923.
- 124.- Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, et al. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997; 111: 1114-120.
- 125.- Hibi K, Robinson CR, Booker S, et al. Molecular detection of genetics alterations in serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1998; 58: 1405-1407.
- 126.- Fournie GJ, Martres F, Pourrat JP, et al. Plasma DNA as cell death marker in elderly patients. *Gerontology* 1993; 39: 215-221.
- 127.- Silva JM, Garcia JM, Dominguez G, et al. Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 71-76.

-
- 128.- Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218-224.
- 129.- Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, et al. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett* 1995; 91: 221-227.
- 130.- Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res* 1975; 35: 2375-2382.
- 131.- Stroun M, Anker P. Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles. *Biochem J* 1972; 128: 100-104.
- 132.- Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, et al. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 1685-1689.
- 133.- Rogers JC. Identification of an intracellular precursor to DNA excreted by human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 3211-3215.
- 134.- Rogers JC, Kerstiens JW. Capping of DNA on phytohemagglutinin-stimulated human lymphoblasts. *J Immunol* 1981; 126: 703-705.
- 135.- Fournie GJ, Lambert PH, Meischer PA. Release of DNA in circulating blood and induction of anti-DNA antibodies after injection of bacterial lipopolysaccharides. *J Exp Med* 1974; 140: 1189-1206.
- 136.- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 139-142.
- 137.- Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, et al. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1159-1164.
- 138.- Chen XQ, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, et al. Detecting tumour-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2297-2303.
- 139.- Gonzalez R, Silva JM, Sanchez A, et al. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance. *Ann Oncol.* 2000; 11: 1097-1104.
- 140.- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; 51: 5054-5059.

-
- 141.- Hamana K, Uzawa K, Ogawara K, et al. Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 2181-2184.
- 142.- Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* 2005; 49: 1-12.
- 143.- Hampton R, Walker M, Marshall J, et al. Differential expression of carcinoembryonic antigen (CEA) splice variants in whole blood of colon cancer patients and healthy volunteers: implication for the detection of circulating colon cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 7817-7823.
- 144.- Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res* 2003; 63: 7641-7645.
- 145.- Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, et al. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res* 2005; 65: 1141-1145.
- 146.- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 7351-7367.
- 147.- O'Connell P. Genetic and cytogenetic analyses of breast cancer yield different perspectives of a complex disease. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78: 347-357.
- 148.- Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820.
- 149.- Dickson RB, Lippman ME. Oncogenes, suppressor genes, and signal transduction. In: Harris J, Lippman ME, Morrow M, eds.: *Diseases of the breast*. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp 281-302.
- 150.- Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, et al. The p53 network. *J Biol Chem* 1998; 273: 1-4.
- 151.- Dickson RB, Pestell RG, Lippman ME. Cancer of the Breast. *Molecular Biology of Breast Cancer*. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds.: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 7th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, pp 1399-1414.
- 152.- Anderson LA, Friedman L, Osborne-Lawrence S, et al. High-density genetic map of the BRCA1 region of chromosome 17q12-q21. *Genomics* 1993; 17: 618-623.
- 153.- Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, et al. Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat Med* 1997; 3: 621-624.

-
- 154.- Skirnisdottir S, Eiriksdottir G, Baldursson T, et al. High frequency of allelic imbalance at chromosome region 16q22-23 in human breast cancer: correlation with high PgR and low S phase. *Int J Cancer* 1995; 64: 112-116.
- 155.- Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, et al. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* 1996; 274: 2057-2059.
- 156.- Patel U, Grundfest-Broniatowski S, Gupta M, et al. Microsatellite instabilities at five chromosomes in primary breast tumors. *Oncogene* 1994; 9: 3695-3700.
- 157.- Brenner AJ, Aldaz CM. Chromosome 9p allelic loss and p16/CDKN2 in breast cancer and evidence of p16 inactivation in immortal breast epithelial cells. *Cancer Res* 1995; 55: 2892-2895.
- 158.- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-879.
- 159.- Armitage P, Berry G. *Statistical Methods in Medical Research*. 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987, pp 75-89.
- 160.- Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481.
- 161.- Peto R, Pike MC, Armitage P, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observations of each patients: II. Analysis and examples. *Br J Cancer* 1997; 35: 1-39.
- 162.- Cox D. R. Regression models and life tables. *J Stat Soc* 1972; 34: 187-220.
- 163.- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutation of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with Myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 86: 774-779.
- 164.- Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1999; 59: 3251-3256.
- 165.- Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, et al. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1293-1299.
- 166.- Silva JM, Gonzalez R, Dominguez G, et al. TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 24: 160-161.
- 167.- Kirk GD, Camus-Randon AM, Mendy M, et al. Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma from The Gambia. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 148-153.

-
- 168.- Frickhofen N, Muller E, Sandherr M, et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood* 1997; 90: 4953-4960.
- 169.- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:1033-1035.
- 170.- Nawroz H, Koch W, Anker P, et al. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 1035-1037.
- 171.- Sánchez-Céspedes M, Monzó M, Rosell R, et al. Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 1998; 9: 113-116.
- 172.- Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, et al. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res* 2000; 60: 707-711.
- 173.- Fujiwara Y, Chi DD, Wang H, et al. Plasma DNA microsatellites as tumor-specific markers and indicators of tumor progression in melanoma patients. *Cancer Res* 1999; 59: 1567-1571.
- 174.- Goessl C, Heicapell R, Munker R, et al. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 4728-4732.
- 175.- Kolble K, Ullrich OM, Pidde H, et al. Microsatellite alterations in serum DNA of patients with colorectal cancer. *Lab Invest* 1999; 79: 1145-1150.
- 176.- Shaw JA, Smith BM, Walsh T, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1119-1124.
- 177.- Esteller M, Sánchez-Céspedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 67-70.
- 178.- Gonzalez R, Silva JM, Dominguez G, et al. Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 loci in breast cancer: pathological correlations. *Br J Cancer* 1999; 81: 503-509.
- 179.- Sánchez-Céspedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60: 892-895.
- 180.- Wong IHM, Lo YMD, Zhang J, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 71-73.
- 181.- Kawakami K, Brabender J, Lord RV, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1805-1811.

-
- 182.- Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22: 5108-5121.
- 183.- Lei KI, Chan LY, Chan WY, et al. Diagnostic and prognostic implications of circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in natural killer/T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 29-34.
- 184.- Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, et al. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC Cancer* 2001; 1:2.
- 185.- Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, et al. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 105: 361-370.
- 186.- Tong YK, Lo YM. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta*. 2006; 363: 187-196.
- 187.- Swisher EM, Wollan M, Mahtani SM, et al. Tumor-specific p53 sequences in blood and peritoneal fluid of women with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 662-667.
- 188.- Sant M, Allemani C, Berrino F, et al. Breast carcinoma survival in Europe and the United States. *Cancer* 2004; 100:715-722.
- 189.- Castells A, Puig P, Mora J, et al. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: Diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1999; 17: 578-584.
- 190.- Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 4675-4678.
- 191.- Wang Q, Larson PS, Schlechter BL, et al. Loss of heterozygosity in serial plasma DNA samples during follow-up of women with breast cancer. *Int J Cancer* 2003; 106: 923-929.
- 192.- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of adjuvant tamoxifen and of cytotoxic therapy on mortality in early breast cancer. An overview of 61 randomized trials among 28,896 women. *N Engl J Med* 1988; 319: 1681-1692.
- 193.- O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SAW, et al. Análisis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesion at 15 genetic loci. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90: 690-703.
- 194.- Silva JM, Sánchez A, Miralles, et al. Tumor DNA in plasma of breast cancer patients. Relation to treatment. *Rev Oncología* 2000; 2: 141-145.

-
- 195.- Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol* 2005; 23: 619-629.
- 196.- Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, et al. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1961-1965.
- 197.- Garcia V, Garcia JM, Pena C, et al. Thymidylate synthase messenger RNA expression in plasma from patients with colon cancer: prognostic potential. *Clin Cancer Res* 2006; 2: 2095-2100.
- 198.- Silva JM, Dominguez G, Silva J, et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2821-2825.
- 199.- Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, et al. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 2001; 488: 119-133.
- 200.- Tseng LM, Yin PH, Chi CW, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 629-638.
- 201.- Vlems FA, Ruers TJM, Punt CJA, et al. Relevance of disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with solid epithelial tumours in perspective. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 289-302.
- 202.- Zehentner BK, Persing DH, Deme A, et al. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. *Clin Chem* 2004; 50: 2069-2076.
- 203.- Taubert H, Blumke K, Bilkenroth U, et al. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gyn Oncol* 2004; 92: 256-261.
- 204.- Stathopoulos EN, Sanidas E, Kafousi M, et al. Detection of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of breast cancer patients with histologically and immunohistochemically negative axillary lymph nodes. *Ann Oncol* 2005; 16: 240-246.
- 205.- Ferrucci PF, Rabascio C, Mazzetta C, et al. Mammaglobin expression in leukapheresis products is a predictive marker of poor prognosis in women with high-risk breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6039-6046.
- 206.- Shimada K, Murakami K, Shozu M, et al. Sex-determining region Y levels in maternal plasma: evaluation in abnormal pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 30: 148-154.
- 207.- Lo YM, Rainer TH, Chan LY. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem* 2000; 46: 319-323.

208.- Rainer TH, Wong LK and Lam W et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 2003; 49: 562-569.